UNTERSUCHUNGEN VON MUTANTEN DES NIKKOMYCIN-PRODUZENTEN TÜ 901

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JÜRGEN LANGHÄRIG

aus

Karlsruhe

1981

UNTERSUCHUNGEN VON MUTANTEN DES NIKKOMYCIN-PRODUZENTEN TÜ 901

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JÜRGEN LANGHÄRIG

aus

Karlsruhe

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1981

Dekan: Professor Dr. A. Hager

1. Berichterstatter Professor Dr. H. Zähner

2. Berichterstatter Professor Dr. V. Braun

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	E I N L E I T U N G	1
2.	M A T E R I A L und M E T H O D E N	9
2.1.	Chemikalien, Antibiotika und Antagonisten	9
2.2.	Nährmedien	11
2.2.1.	Konzentration der Supplemente in den Medien	13
2.3.	Organismen	14
2.3.1.	Züchtungsbedingungen	14
2.3.2.	Aufbewahrung der Stämme	14
2.3.3.	Herstellung einer Sporensuspension	15
2.4.	Gewinnung und Charakterisierung von Mutanten	15
2.4.1.	Isolierung von Mutanten	15
2.4.1.1.	Gewinnung von Mutanten durch NTG-Mutagenese	15
2.4.1.2.	Induktion von Mutationen durch UV (254 nm)	16
2.4.1.3.	8-Methoxypsoralen Mutagenese	17
2.4.1.4.	Äthyl-Methan-Sulfonsäure-Mutagenese	17
2.4.1.5.	Gewinnung von Resistenzmutation	17

		Seite
2.4.2.	Charakterisierung von Mutanten	18
2.4.3.	Kreuztest	20
2.4.4.	Gradientenplatten	20
2.5.	Optimierung des Wachstums	21
2.5.1.	C-Quellen Test	21
2.5.2.	Temperaturgradient	21
2.6.	Schüttelkolbenversuche	22
2.6.1.	Suche nach Produzenten mit verändertem Nikkomycin-Produktionsmuster	22
2.6.2.	Verfütterungsexperimente	22
2.6.2.1.	Resting-Cell Versuch	23
2.7.	Bestimmung des Nikkomcingehalts durch HPLC	24
2.7.1.	Apparatur	24
2.7.2.	Detektor	24
2.7.3.	Säule	24
2.7.4.	Probenbereitung	25
2.8.	Bestimmung des Myceltrockengewichts	25
2.9.	Herstellung von Protplasten	26
3.	E R G E B N I S S E	27

		Seite
3.1.	Wachstumsoptimierung	27
3.1.1.	Optimierung der C-Quelle	27
3.1.2.	Ermittlung des Temperatur-optimismus	28
3.2.	Mutagenesen	28
3.2.1.	NTG-Mutagenese	28
3.2.2.	UV-Mutagenese bei 254 nm	29
3.2.3.	UV/MOP-Mutagenese	30
3.3.	Versuche zur Biogeneseauf-klärung der Nikkomycine	31
3.3.1.	Mutanten von Tü 901	32
3.3.2.	Suche nach Mutanten mit veränderter Nikkomycinsynthese	36
3.3.2.1.	Selektive Produktion der Nikko-mycine mit 4-Formyl-4-imidazolin-2-on als Nukleobase	38
3.3.2.2.	Selektive Produktion der Nikko-mycine mit Uracil als Nukleobase	39
3.3.3.	Nikkomycin-Produktion in einem Resting-Cell System	41
3.3.3.1.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/23 (his^-)	43
3.3.3.2.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/157 (ade^-)	44
3.3.3.3.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/112 (trp^-)	45

		Seite
3.3.3.4.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/178 (phe^-)	46
3.3.3.5.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/292 (ura^-, his^-)	48
3.3.3.6.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/251 (ura^-, pur^-)	49
3.3.3.7.	Kombinationsverfütterung mit der Mutante 901/23 (his^-)	50
3.3.4.	Leucin-, Isoleucin-, Valin-Effekt	52
3.3.4.1.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/282 (val^-, leu^-, his^-, pur^-)	52
3.3.4.2.	Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/295 (ile^-, val^-, ura^-)	54
3.4.	Suche nach neuen Sekundärmetaboliten	56
3.5.	Suche nach Regulationsmutanten in der Histidinbiosynthese	57
3.6.	Suche nach Resistenzmutanten	59
4.	D I S K U S S I O N	61
4.1.	Biogenese der Basen in den Nikkomycinen	61
4.1.1.	Überlegungen zur Biogenese von Nikkomycin C	61
4.1.2.	Überlegungen zur Biogenese von Nikkomycin C_x	62

Seite

4.1.3.	Vergleich der 5-Ringbase der Nikkomycine mit anderen natürlichen Nukleosidantibiotika	67
4.2.	Gezielte Produktion einzelner Nikkomycine	71
4.3.	Überlegungen zu einer gezielten Produktionssteigerung	71
4.4.	Variationsmöglichkeiten für die Nikkomycine	73
4.5.	Überlegungen zur Biogenese von Nikkomycin D	76
4.5.1.	Überlegungen zur Biogenese des Pyridinrings in den Nikkomycinen	76
4.5.2.	Überlegungen zur Biogenese des aliphatischen Rests im Nikkomycin D	78
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	80
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	81

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

ade	Adenin
bio	Biotin
chol	Cholin
EMS	Methansulfonsäureaethylester
FT	Fluortyrosin
gua	Guanin
hisol	Histidinol
hom	Homoserin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
LM	Luftmycel
inos	Inosit
Mel^-	Melanin-negativ
Mel^+	starke Melaninbildung
MES	2(N-Morpholino)äthansulfonsäure
MHK	Minimale hemmende Konzentration
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOP	8-Methoxypsoralen
nic	Nicotinamid
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

oro	Orotsäure
pAB	p-Aminobenzoesäure
pant	Pantothensäure
pdx	Pyridoxin
PEP	Phosphoenolpyruvat
pur	Adenin + Guanin
RC	Resting-Cell
rib	Riboflavin
Rib	Ribose
Rif	Rifampicin
rpm	rounds per minute
Str	Streptomycin
thia	Thiamin
thy	Thymidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
Tü	Stammsammlung des Lehrbereichs Mikrobiologie I der Universität Tübingen
UMP	Uracilmonophosphat
ura	Uracil
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
xan	Xanthin

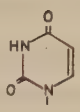
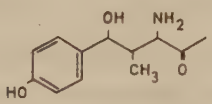
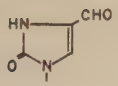
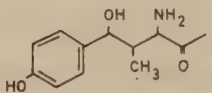
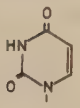
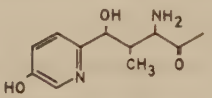
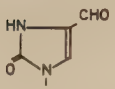
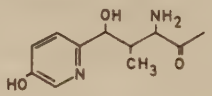
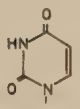
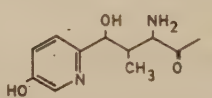
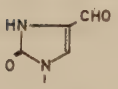
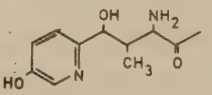
1. EINLEITUNG

Die Nikkomycine sind Nucleosidantibiotika. Sie wurden aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces tendae Ettlinger - Tü 901 - isoliert und ihre Konstitution konnte durch chemischen Abbau und mit spektroskopischen Methoden aufgeklärt werden (DÄHN et al., 1976; HAGENMAIER et al., 1979; KÖNIG et al., 1980). Einen Überblick über die bisher bekannten Nikkomycine gibt Tabelle 1. Ähnlich wie die bekannten Polyoxine (ISONO et al., 1980) bestehen die Nikkomycine aus einem Aminosäurebaustein, einer 5-Aminohexuronsäure und einer N-glycosidisch gebundenen heterocyclischen Base. Tabelle 2 a und b zeigt die Polyoxine und Neopolyoxine.

Die Wirkung der Nikkomycine und Polyoxine liegt in der Hemmung der Chitinsynthetase aus Pilzen (DÄHN et al., 1976; BRILLINGER, 1979; SASAKI et al., 1968; ENDO et al., 1970; HORI et al., 1971) und wie kürzlich gezeigt wurde, auch in der Hemmung der Chitinsynthetase aus dem Insekt Tribolium castaneum (COHEN und CASIDA, 1980). ZOEBELEIN (1979) wies auf die gute Wirkung von Nikkomycin Z und X gegen Spinnmilben hin.

Die Polyoxine finden in der Landwirtschaft Verwendung wegen ihrer guten Wirksamkeit gegen phytopathogene Pilze, wie Alternaria kikuchiana, Pellicularia sasakii und Cochliobolus miyabeanus (MISATO, 1977).

Tabelle 1: Zusammenstellung der bisher bekannten Nikkomycine

NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
B			OH
B_X			OH
Z			OH
X			OH
J			Glu
I			Glu

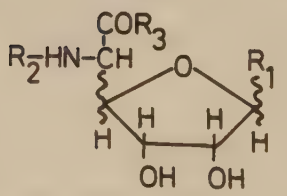
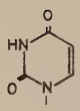
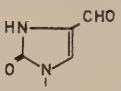
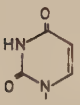
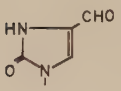
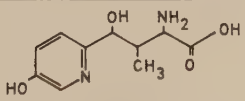
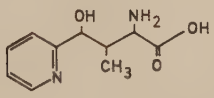


Tabelle 1: Fortsetzung

NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
N		H	Glu
M		H	Glu
C		H	OH
C_x		H	OH
D			
E			

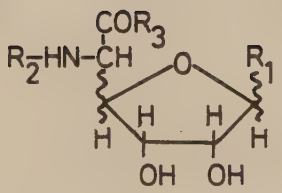
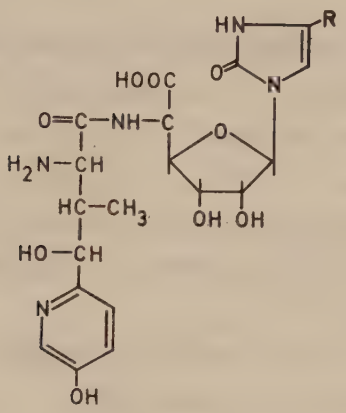


Tabelle 2a: Zusammenstellung der bisher bekannten Polyoxine

Polyoxin	R_1	R_2	R_3
A	CH_2OH		OH
B	CH_2OH	OH	OH
D	COOH	OH	OH
E	COOH	OH	H
F	COOH		OH
G	CH_2OH	OH	H
H	CH_3		OH
J	CH_3	OH	OH
K	H		OH
L	H	OH	OH
M	H	OH	H

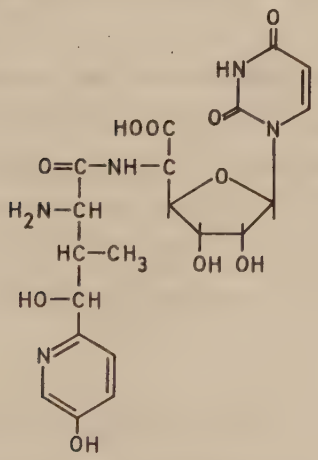
Polyoxin	R
C	OH
I	

Tabelle 2 b: Zusammenstellung der bisher bekannten Neopolyoxine



Neopolyoxin A: R= —CHO

Neopolyoxin B: R= —COOH



Neopolyoxin C

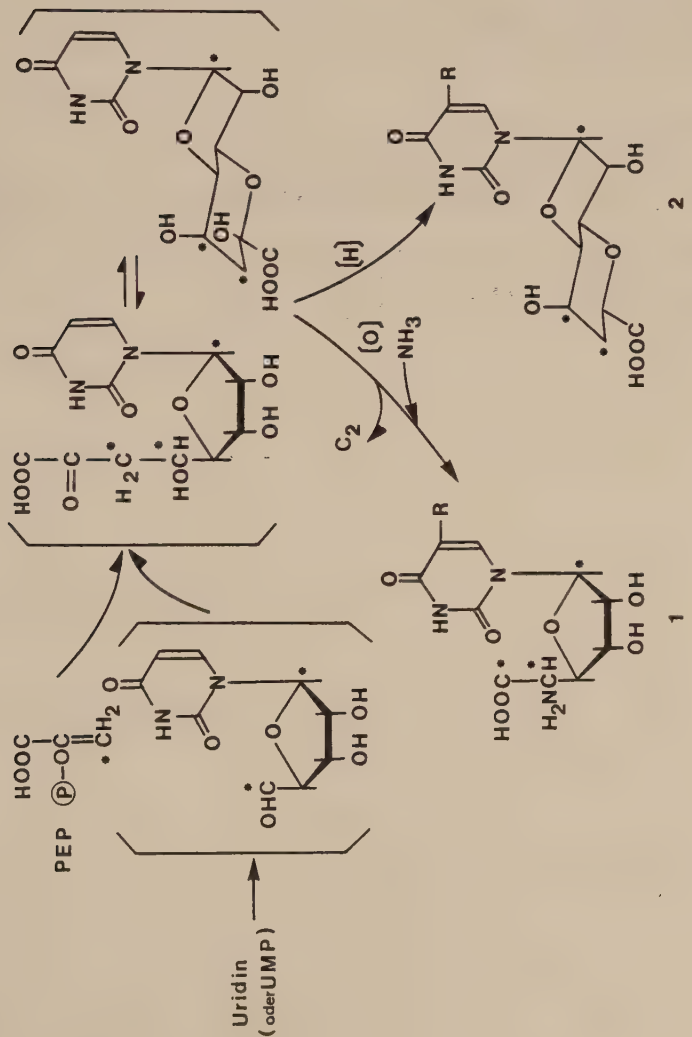
ISONO et al. (1978) schlugen für die Biosynthese des Polyoxins C und der Oxtosylsäuren den in Abb. 1 dargestellten Weg vor.
^{13}C und ^{14}C Markierungsstudien zeigten, daß die Aminouronsäure der Polyoxine und des Octoseskeletts der Octosylsäuren über eine Kondensation von Ribose mit Phosphoenolpyruvat entsteht.
C_1-Donator des 5-substituierten Uracils in den Polyoxinen ist das C-3 des Serins (ISONO und SUHADOLNIK, 1976).

Für die Biogenese der Imidazolnukleoside aus den Neopolyoxinen A und B schlägt URAMATO et al. (1980) eine Ringkontraktion des Uracilnucleosids vor, ähnlich der chemischen Transformation von C-5 substituierten Uracilnukleosiden zu Imidazolnukleosiden (OTTER et al., 1969).

Die strukturelle Verwandtschaft der Polyoxine und Neopolyoxine mit den Nikkomycinen läßt eine ähnliche Biosynthese erwarten. Eine Möglichkeit, die Biogenese von Metaboliten aufzuklären ist, neben dem Einsatz markierter Vorstufen (z.B. ^{14}C, ^{3}H, ^{2}H, ^{13}C), die Verwendung von Mutanten, die in der Synthese des Antibiotikums blockiert sind.

In dieser Arbeit sollten die Möglichkeiten ausgeschöpft werden, die in der Verwendung von Stoffwechselmutanten des Stamms TÜ 901 liegen. Ein Ziel war, Informationen über die Nukleosidbiogenese zu erhalten. Diese sollten sowohl

Abb. 1: Vorgeschlagener Biosyntheseweg des Nukleosidskeletts der Polyoxine (1) (R= $-CH_3$, $-CH_2OH$,-COOH) und der Octosylsäuren (2) (R= $-CH_2OH$,-COOH).
(*) ^{13}C-Verteilung nach Abbau von D- 1-^{13}C Glucose (Isono et al., 1978).



für eine selektive Produktion von bestimmten Nikkomycinen, als auch für eine gezielte Produktionssteigerung genutzt werden. Mutanten sind Voraussetzung für die Mutasynthese (DAUM und LEMKE, 1979) und bieten sich als "neue" Organismen für ein gezieltes Screening an (MARTINELLI et al., 1978; WHITE et al., 1974).

Ebenso sind Mutanten Voraussetzung für den Nachweis von Rekombinationsereignissen und die Aufstellung einer genetischen Karte (SERMONTI und SPADA-SERMONTI, 1956; HOPWOOD, 1967; SCHUPP, 1975). Dieser Teilaspekt wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien, Antibiotika und Antagonisten

Mit Ausnahme der unten aufgeführten Reagentien wurden analysenreine Präparate der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	Rifampicin
Calbiochem., Los Angeles, California, USA	DL- α Methylhistidin
Deutsche Maizena-Werke, Hamburg	Mannit Stärke
Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA	Bacto-Agar
Fluka AG, Buchs, Schweiz	3-Amino-1,2,4-Triazol L-2,4-Diaminobuttersäure-dihydrochlorid D-Histidin-Monohydrochlorid-monohydrat L-Homoserin

K & K Laboratories, Inc. Plainview, N.Y., Hollywood, Calif., USA	DL-M-Fluortyrosin
Oxoid Deutschland, Wesel	Hefeextrakt
Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg	L-Histidinol 2 HCl Methansulfonsäureaethylester (EMS) Tween 80 Uracil Urocaninsäure
Sigma Chemical Company, St. Louis, USA	2 (N-Morpholino) äthansulfonsäure (MES) 8-Methoxypsoralen (MOP) Orotsäure 2-Thiazolyl-DL-Alanin DL-1,2,4-Triazol-3-Alanin
EGA-Chemie, Keppler & Reif, Steinheim, Albuch	N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (NTG)

Alle in dieser Arbeit verwendeten, hier nicht speziell aufgeführten Antibiotika, sind der Antibiotikasammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie I der Universität Tübingen entnommen.

2.2. Nährmedien

Alle Medien für Submerskulturen und Stammhaltung wurden 20 min bei 120° C im Autoklaven sterilisiert. Für die Herstellung von festen Medien wurden jeweils 2 % Agar (Difco) zugegeben.

M1: Vollmedium nach MÜLLER (1968)

4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt, 2 g Glucose; pH 7.2; mit Leitungswasser ad 1000 ml

M2: Minimalmedium nach HOPWOOD (1977)

10 g Glycerin, 1 g K_2HPO_4, 1 g Asparagin, 2 ml Salzlösung; pH 7.0; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml

Salzlösung: 40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3$ X 6 H_2O, 10 mg $CuCl_2$ X H_2O, 10 mg $MnCl_2$ X 4 H_2O, 10 mg $Na_2B_4O_7$ X 10 H_2O; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

M3: Resting Cell Medium nach KURTH (1981)

10 g Mannit, 0,5 g Asparagin, 50 mM MES Puffer, 10 ml Salzlösung; pH 6; mit Saline ad 1000 ml

Salzlösung: 100 mg $MgSO_4$ X 7_2O, 20 mg $FeSO_4$ X 7 H_2O, 10 mg $ZnSO_4$, X 7 H_2O, 100 mg KCl, 5 mg $CuSO_4$ X 7 H_2O, 100 mg $CaCl_2$; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

M4: Vollmedium nach DEHLER (1979)

30 g Mannit, 10 g Stärke, 20 g Sojamehl, 10 g Hefeextrakt; pH 7; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

M5: Medium C-Quellen-Test (PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948)

5,65 g K_2HPO_4, 2,38 g KH_2PO_4, 2,64 g $(NH_4)_2SO_4$, 1 g $MgSO_4$ X 7 H_2O, 6,4 g $CuSO_4$ X 5 H_2O, 1,1 mg $FeSO_4$ X 7 H_2O, 7,9 mg $MnCl_2$ X 4 H_2O, 1,5 mg $ZnSO_4$ X 7 H_2O; mit entionisiertem Wasser ad 800 ml; C-Quelle 10 g in 200 ml entionisiertem Wasser.

M6: Topagar

9 g NaCl, 7 g Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

M7: Medium S nach OKANISHI et al. (1974)

10 g Glucose, 4 g Difco Bacto Pepton, 4 g Difco Hefeextrakt, 0,5 g $MgSO_4$ X 7 H_2O, 2 g KH_2PO_4, 4 g K_2HPO_4; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

M8: Medium P nach OKANISHI et al. (1974)

103 g Saccharose, 0,25 g K_2SO_4, 2,03 g $MgCl_2$ X 6 H_2O; 2 ml Spurenelementlösung*, 10 ml KH_2PO_4 (0,5 %)*, 100 ml $CaCl_2$ X 2 H_2O (3,68 %)*, 100 ml TES Puffer (0,25 M, pH 7,2)*; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

Spurenelementlösung: 40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3$ X 6 H_2O, 10 mg $CuCl_2$ X 2 H_2O, 10 mg $MnCl_2$ X H_2O, 10 mg $Na_2B_4O_7$ X 10 H_2O, 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ X 4 H_2O; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

*) Zugabe erfolgt nach dem Autoklavieren.

2.2.1. Konzentrationen der Supplemente in den Medien

Aminosäuren je	0,1	mg/ml
Purine und Pyrimidine je	0,02	mg/ml
Vitamine je	0,002	mg/ml
Streptomycin	50	µg/ml
Rifampicin	50	µg/ml
Novobiocin	80	µg/ml
Tetracyclin	40	µg/ml
Spectinomycin	50	µg/ml
DL-M-Fluortyrosin	50	µg/ml
DL-α Methyl Histidinhydrochlorid	50	µg/ml
DL-1,2,4 Triazol-3-Alanin	50	µg/ml
2-Thiazol-Alanin	50	µg/ml
3-Amino-1,2,4-Triazol	50	µg/ml
4-Amino-1,2,4-Triazol	50	µg/ml
D-Histidinmonohydrochlorid	50	µg/ml

Aminosäuren und Vorstufen, Purine, Pyrimidine und Vitamine wurden mit den Medien autoklaviert. Die Antibiotika und Antagonisten wurden steril bezogen und den autoklavierten Medien nach Abkühlen auf ca. 50° C zugegeben.

2.3. Organismen

Gegenstand der Untersuchungen war Streptomyces tendae Ettlinger - Tü 901 - der Produzent der Nikkomycine.

2.3.1. Züchtungsbedingungen

Die Kulturen wurden auf festen Medien bei 37° C inkubiert. Für die Nikkomycinproduktion brachte die Inkubation bei 27° C bessere Ergebnisse.

2.3.2. Aufbewahrung der Stämme

Da sich die Stämme während der Aufbewahrung bezüglich Sporulation, Melanin-Bildung etc. veränderten, wurden verschiedene Aufbewahrungsmethoden parallel verwendet. Für den täglichen Gebrauch wurden die Stämme auf Schrägagar aus M1 Vollmedium bei 4° C aufbewahrt. Sporen wurden in 30 % Glycerin bei -20° C tiefgefroren oder nach der Methode von HOPWOOD und FERGUSON (1969) lyophilisiert. Für Verfütterungsexperimente wurden die Stämme jeweils geklont und die Marken überprüft.

2.3.3. Herstellung einer Sporensuspension

Mit einer auf einem Schrägröhrchen gezogenen Kultur wurde 100 ml M1-Agar, der in einem 500 ml Erlenmeyerkolben schräg eingegossen war, angeimpft. Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Sporen mit 30 ml Tween-Wasser abgeschwemmt, die Sporenketten wurden durch Schütteln mit Glasperlen zerschlagen. Diese Suspension wurde durch Glaswolle filtriert und zwei mal mit Saline gewaschen.

2.4. Gewinnung und Charakterisierung von Mutanten

2.4.1. Isolierung von Mutanten

2.4.1.1. Gewinnung von Mutanten durch NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) Mutagenese

Zu 9 ml Sporensuspension von 10^8 Zellen/ml wurde 1 ml Tris-Maleat Puffer pH 9,0;0,5 M und 2 mg NTG/ml gegeben. Die Inkubationstemperatur betrug 30° C und alle 4 Minuten wurde 0,5 bzw. 1 ml Probe entnommen. Die Proben wurden 2 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 3200 abzentrifugiert und zweimal mit Saline gewaschen. Nach jeder Mutagenese wurde zuerst der Titer der überlebenden keimfähigen Sporenfraktion bestimmt. Dazu wurden von jeder Probe Ver-

dünnungsstufen angesetzt und mit Top-Agar auf 30 ml-M1-Agar-Platten gegossen. Die Sporensuspension des Zeitwertes mit 0,1 % Überlebensrate wurde in solcher Verdünnung auf Vollmedium M1 ausgesät, daß auf den Platten 50 - 100 Kolonien wuchsen. Die nach 4-5 Inkubationstagen bewachsenen Platten wurden auf M2-Minimal- und M1-Vollmedium mit Hilfe eines Samtstempels repliziert. Nach ein und zwei Tagen wurden die beiden Replicaplatten miteinander verglichen und die vermuteten auxotrophen Kolonien auf Vollmediumplatten übertragen. Nach einer zweiten Prüfung wurden die mutierten Stämme durch Klonen gereinigt und das Wuchsstoffbedürfnis bestimmt.

2.4.1.2. Induktion von Mutationen durch UV (254 nm)

Eine Sporensuspension von 10^8 Zellen/ml wurde bei 27° C unter leichtem Rühren auf einem Magnetrührer mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Der Abstand zwischen der UV-Lampe (Camag-Universal UV-Lampe Typ TL-900) und dem Boden der Petrischale betrug 20 cm. Der Versuch wurde im Dunkeln durchgeführt. Die Bestimmung der Überlebensrate und die Suche nach auxotrophen Kolonien erfolgte wie unter 2.4.1.1. beschrieben.

2.4.1.3. 8-Methoxypsoralen (MOP) Mutagenese

Nach der Methode von TOWNSEND et al. (1971) wurde zu einer Sporensuspension eine äthanolische Lösung von MOP zugegeben. Die Endkonzentration an MOP betrug 0,1 mg/ml. Dieser Mutagenesansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurde diese Sporensuspension wie unter 2.4.1.2. beschrieben mit UV-Licht bestrahlt. Das UV-Licht hatte eine Wellenlänge von 365 nm.

2.4.1.4. Äthyl-Methan-Sulfonsäure-Mutangese (EMS)

10^8 Sporen/ml wurden in 0,05 M Natriumacetatlösung und 0,1 mM Magnesiumsulfat bei einem pH-Wert $\geq$ 6.6 suspendiert. Die EMS Konzentration betrug 1 ml EMS/10 ml Sporensuspension. Der Versuch wurde wie die NTG-Mutagenese durchgeführt.

2.4.1.5. Gewinnung von Resistenzmutanten

Wildtyp oder Mutantensporen wurden auf Voll- bzw. Minimalmedienplatten ausgesät, die die unter 2.2.1. aufgeführten Konzentrationen an Antibiotikum bzw. Antimetaboliten enthielten. Die auf diesen Platten wachsenden und somit

spontan resistenten Mutatenkolonien wurden isoliert und gereinigt.

2.4.2. Charakterisierung von Mutanten

Die Wuchsstoffbedürfnisse der einzelnen Mutanten wurden nach der Methode von HOLLIDAY (1956) bestimmt. Nach dieser Methode wurden die zu charakterisierenden auxotrophen Mutanten auf eine M1-Vollmedienplatte ausgestrichen und bis zur Sporulation inkubiert. Diese Vorlageplatte wurde auf neun M2-Minimalmedienplatten, die jeweils unterschiedliche Gruppen an Supplementen enthielten (Tab. 3) und eine Vollmedienplatte (Kontrolle) repliziert. Aufgrund unterschiedlicher Wachstumsmuster konnten die Einfachbedürfnisse und in einigen Fällen die Mehrfachbedürfnisse der auxotrophen Mutanten charakterisiert werden.

Tabelle 3: Verteilung der Supplemente in den einzelnen Minimalmedienplatten zur Charakterisierung von Wuchsstoffbedürfnissen auxotropher Mutanten

Platte 1	Platte 2	Platte 3	Platte 4	Platte 5	Platte 6	Platte 7	Platte 8	Platte 9
thia	inos	arg	glu	ser	glu	thy	hom	thia
nic	nic	rib	pdx	pant	bio	pAB	chol	inos
rib	lys	lys	val	met	cys	leu	ile	ura
pdx	val	phe	phe	tyr	trp	his	thr	glu
pan	met	tyr	pro	pro	asp	ala	gly	ser
bio	cys	trp	asp	glu	gln	ade	xan	glu
pAB	leu	his	ala	xan	gua	gua	ura	thy
chol	ile	thr	gly	ade	ura	cyt	cys	hom
ade	thr							asn

2.4.3. Kreuztest

Die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Substanzen wurde mit Hilfe von Kreuztests nach ZÄHNER und MAAS (1972) untersucht.

2.4.4. Gradientenplatten

In Petrischalen wurden 10 ml M2-Agar gegossen, der den Antagonisten in einer Konzentration von 10 mM enthielt. Die Platten standen dabei auf einer schiefen Ebene, deren Neigung so bemessen war, daß die Agarschicht an einem Ende den Boden der Platte noch bedeckte. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten plan gestellt und eine zweite Schicht ohne Antagonist gegossen. In Richtung des abnehmenden Gradienten wurden Kolonien parallel ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37° C inkubiert und nach 2 und 3 Tagen ausgewertet.

2.5. Optimierung des Wachstums

2.5.1. C-Quellen Test

Der Test wurde auf M5 Minimalmedium-Agar-Platten (PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948) durchgeführt. Nach Ausstreichen des Stammes auf Platten wurde das Wachstum 3 Tage später beurteilt.

2.5.2. Temperaturgradient

Die optimale Wachstumstemperatur wurde in dem Gerät Temperature Gradient Incubator, Model TN-3, Toyo Kagak Sangyo Co., Ltd., Tokio, Japan, ermittelt. Die Temperatureinstellung war von 20° - 50° C gewählt. 30 rechtwinkelig gebogene Reagenzgläser von ca. 1° C Temperaturunterschied wurden jeweils mit 9 ml M1 Medium gefüllt und mit 1 ml einer 48 Stunden alten Vorkultur angeimpft. Das Wachstum wurde in drei hintereinanderliegenden Tagen kontrolliert.

2.6. Schüttelkolbensuche

2.6.1. Suche nach Produzenten mit verändertem Nikkomycin-Produktionsmuster

Die Versuche wurden submers in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichem Einstich durchgeführt. Die Kolben waren mit 100 ml M4 Medium gefüllt und wurden bei 27° C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 rpm und 25 mm Auslenkradius inkubiert. Als Impfmaterial diente eine auf einem Schrägröhrchen gewachsene Kultur.
Nach 2,5 und 6 Tagen wurden ca. 20 ml Probe entnommen und zur späteren Bestimmung des Nikkomycingehalts bei -20° C eingefroren.

2.6.2. Verfütterungsexperimente

Die Supplemente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit den Medien autoklaviert.

2.6.2.1. Resting Cell-Versuch

100 ml des Mediums M4 wurden mit 0,1 ml einer Sporensuspension des Stammes Tü 901 angeimpft. Nach 3 Tagen Inkubation bei 27° C wurde das Kulturfiltrat durch Filtration vom Mycel abgetrennt. Das Mycel wurde 2 mal mit Saline gewaschen und 1:10 konzentriert. Danach wurde es im Resting Cell Medium resuspendiert und zum Aushungern 2 Stunden auf der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Anschließend wurde das Mycel durch Filtration zurückgewonnen und erneut im gleichen Volumen Resting Cell Medium resuspendiert. Mit je 10 ml dieser Suspension wurden 30 ml supplementiertes Resting Cell Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane angeimpft. Alle 24 Stunden wurden Proben entnommen. Nach Messen des pH-Wertes wurden diese zur späteren Bestimmung des Nikkomycingehaltes eingefroren.

2.7. Bestimmung des Nikkomycingehalts durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

2.7.1. Apparatur

Es wurden ein Flüssigkeits-Chromatograph, Modell SP 8000-10 (Firma Spectra-Physics) mit einem Autosampler Modell SP 8010 und ein Schoeffel Spektralphotometer Modell SF 770 verwendet.

2.7.2. Detektor

Die Messung erfolgte bei 290 nm Wellenlänge. In 0.01 N HCl hat Nikkomycin Z ein Maximum bei 257 nm (ε = 7300) und eine Schulter bei 289 nm (ε = 4600) und Nikkomycin X ein Maximum bei 286 nm (ε = 14500) (KECKEISEN, 1979). Mit Hilfe eines Eichstandards konnten die Konzentrationen der verschiedenen Nikkomycine bestimmt werden. Die Empfindlichkeit des Detektors war so gewählt, daß 0.1 Extinktionseinheiten einen Vollausschlag ergaben.

2.7.3. Säule

Die rostfreie Stahlsäule (125 mm, 4,6 mm I.D. Knauer) war

mit Merck LiChrosorb RP 8 (5 µm) gefüllt. Als Vorsäule diente eine rostfreie Stahlsäule (40 mm, 4,6 mm I.D. Knauer) gefüllt mit LiChrosorb RP 8 (7 µm).

2.7.4. Probenbereitung

Die Kulturen wurden zentrifugiert und der Überstand über ein Schleicher & Schüll Membranfilter Typ BA 90. 0,6 µm Porendurchmesser filtriert. 10 µl des Filtrats wurden auf die Säule aufgespritzt.

2.8. Bestimmung des Myzeltrockengewichts

5 ml Kulturmedium wurden abgenutscht und mit 10 ml Aqua dest. gewaschen. Das Filtergewicht (MN 615, ø 4,5 cm, Macherey und Nagel, Düren) wurde nach einstündiger Trocknung bei 150° C und 30-minütigem Temperaturausgleich bei Zimmertemperatur bestimmt. Nach dem Abnutschen des Myzels wurde analog verfahren. Aus der Differenz der beiden Messungen ergab sich das Myzeltrockengewicht.

2.9. Herstellung von Protoplasten

Für die Herstellung von Protoplasten wurden die Stämme 4 Tage auf Medium M7, das mit 1,5 % Glycin supplementiert war, vorgezüchtet und durch Abfiltrieren geerntet. 0,1 g pro ml Nassgewicht wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM $MgCl_2$ und 0,3 M Saccharose resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde die Suspension 60 - 80 Minuten mit 1 mg/ml Lysozym bei 30° C inkubiert. Die Bildung der Protoplasten wurde im Mikroskop beobachtet. Bei guter Protoplastierung wurde 4 ml Medium M8 zugegeben und durch Aufsaugen mit einer Pipette gemischt. Durch Filtration durch Glaswatte wurden die Protoplasten vom verbleibendem Mycel getrennt.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Wachstumsoptimierung

Für die Arbeit mit Mutanten erwies es sich als sinnvoll, die Wachstumsbedingungen unabhängig von der Nikkomycin-produktion zu optimieren.

3.1.1. Optimierung der C-Quelle

Hierbei wurde der Test auf C-Quellen-Dissimilation (Medium: PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948) ausgewertet. Es erfolgte eine differenzierte Beurteilung der Wachstumsstärke.

Tab. 4: Wachstum auf verschiedenen C-Quellen

	+++	++	+	+/-	-
D-Glucose	+++				
Saccharose					-
L-Arabinose		++			
D-Xylose				+/-	
Inositol					-
D-Mannitol		++			
D-Fructose	+++				
L-Rhamnose					-
Raffinose					-
D-Galactose		++			
Cellulose					-
Glycerin	+++				

Wachstum: +++ extrem gut, ++ sehr gut, + gut
+/- indifferent, - kein

3.1.2. Ermittlung des Temperaturoptimums

Mit dem unter 2.4.1.2. beschriebenen Gerät wurde eine optimale Wachstumstemperatur von 37° C festgestellt. Wohingegen die höchste Antibiotikaproduktion um neun Grad niedriger bei 28° C lag.

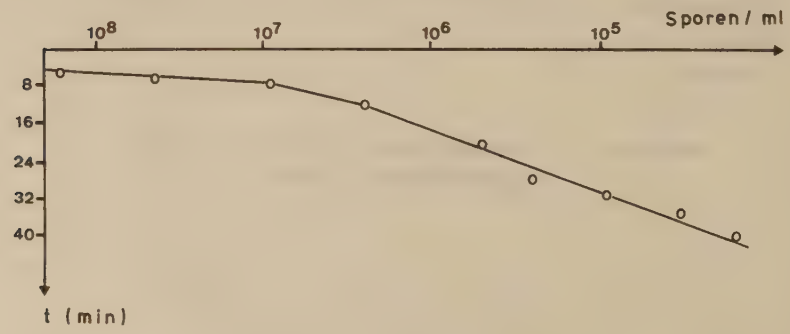
3.2. Mutagenesen

Um auxotrophe Kolonien zu gewinnen, wurden Sporen des Stammes Tü 901 mit verschiedenen Techniken mutagenisiert.

3.2.1. NTG-Mutagenese

Die Mutagenese wurde, wie unter 2.4.1.1. beschrieben, bei dem für Streptomyceten günstigen pH-Wert von 9 durchgeführt (DELIĆ et al., 1970). Bei einer Überlebensrate von 0,1 % ist mit einer hohen Anzahl von Mutanten zu rechnen, die meist nur eine Auxotrophie aufweisen (HOPWOOD, 1970).

Abb. 2: Absterbekurve von Sporen des Stammes Tü 901 unter Einwirkung von 2 mg/ml NTG bei pH 9



Aus der Absterbekurve ergibt sich eine Überlebensrate von ca. 0.1 % nach 24 Minuten Mutagenese. Die Ausbeute an charakterisierbaren Auxotrophen betrug bei diesem Zeitwert 2,23 %.

3.2.2. UV-Mutagenese bei 254 nm

In Abb. 3 ist die Absterbekurve von Sporen von Tü 901 unter dem Einfluß von UV-Licht der Wellenlänge 254 nm zu sehen. Die Methode ist unter 2.4.1.2. beschrieben. 0,1 % Überlebensrate erhält man nach ca. 60 Minuten, von diesen Sporen konnten 1,37 % charakterisiert werden.

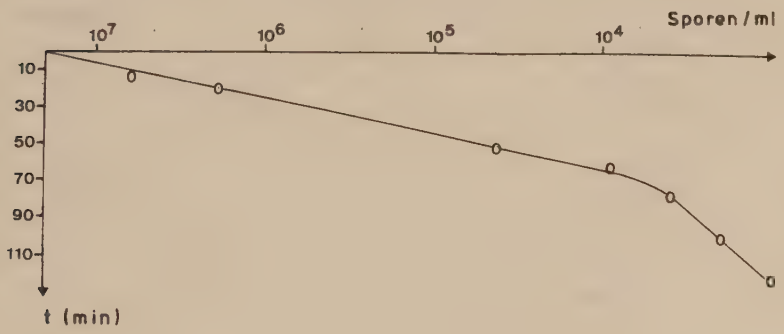
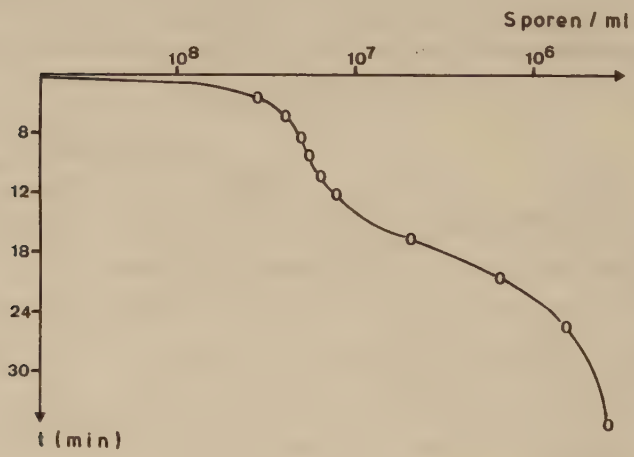


Abb. 3: Absterbekurve von Sporen des Stammes Tü 901 unter Einwirkung von UV-Licht (254 nm)

3.2.3. UV/MOP-Mutagenese

Die UV/MOP Mutagenese nach TOWNSEND et al. (1971), siehe 2.4.1.3., erbrachte nach 26 Minuten eine Überlebensrate von 0,1 %. Unter diesen Sporen befinden sich 0.45 % charakterisierbare auxotrophe Mutanten.

Abb. 4: Absterbekurve von Sporen von Tü 901 unter Einwirkung von UV-Licht (365 nm) in Anwesenheit von 0,1 mg/ml MOP.



3.3. Versuche zur Biogeneseaufklärung der Nikkomycine

Für die experimentelle Erforschung des Stoffwechsels von Sekundärmetaboliten ist es wichtig, diejenigen Punkte des primären Stoffwechselweges zu identifizieren, von denen die sekundären Stoffwechselwege abzweigen. Ein wesentliches Merkmal des Sekundärstoffwechsels ist, daß dieser eine sehr beschränkte Auswahl solcher Vorstufen verwendet, und daß diese Vorstufen auch im pirmären Stoffwechsel von besonderer Wichtigkeit sind (BU' LOCK, 1965).

Das Studium von Mutanten, die in Biosynthesewegen primärer Stoffwechselprodukte blockiert sind, kann deren Notwendigkeit für die Synthese des Sekundärmetaboliten aufzeigen.

3.3.1. Mutanten von Tü 901

In der Tabelle 5 sind die im Verlauf der Arbeit hergestellten Mutanten des Stamms Streptomyces tendae Ettlinger - Tü 901 - aufgeführt.

Tabelle 5: Stämme von Streptomyces tendae Ettlinger

Stamm	Marken	Elter	Entstehung
901/0	WT		
1	Rif^{res}	901/0	Rif
4	ura^- (Orotsäurephospho-ribosyltransferase$^-$)	0	NTG
6	arg^-	0	EMS
7	his^-	0	MOP
8	trp^-	0	MOP
8c	WT	0	(Kurth, 1981)
10	pro^-	0	NTG
11	trp^-	0	NTG
13	pdx^-	0	EMS
19	cyt^-	0	NTG
23	his^-	0	MOP
28	gua^-	0	NTG
36	WT, LM^-	0	UV
37	WT, Mel^-	0	MOP
46	met^-	0	NTG
50	ura^-	0	NTG

Tabelle 5 (Fortsetzung):

Stamm	Marken	Elter	Entstehung
901/53	ade$^-$, gua$^-$	0	UV
67	gua$^-$	0	NTG
70	ade$^-$	0	NTG
75	nic$^-$	0	MOP
77	rib$^-$	0	MOP
87	pro$^-$	0	MOP
90	his$^-$, Rif^{res}	23	Rif
92	WT, LM$^-$	0	spontan
95	thia$^-$	0	MOP
97	thia$^-$, Str^{res}	95	Str
99	his$^-$	0	NTG
103	met$^-$	0	NTG
111	his$^-$, trp$^-$	0	NTG
112	trp$^-$	111	spontan
113	WT	0	NTG
115	trp$^-$	0	NTG
116	thr$^-$	0	NTG
119	arg$^-$	0	NTG
121	gua$^-$	0	NTG
122	arg$^-$, leaky	0	NTG
123	arg$^-$	0	NTG
157	ade$^-$,	0	NTG
158	ura$^-$ (Orotsäurephospho-ribosyltransferase$^-$)	0	NTG

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Stamm	Marken	Elter	Entstehung
901/164	thia$^-$, inos$^-$, leaky	95	MOP
165	thia$^-$, met$^-$	95	MOP
167	thia$^-$	95	MOP
170	pdx$^-$	0	NTG
172	ura$^-$ (Orotsäurereduktase$^-$)	0	NTG
176	ade$^-$, gua$^-$, leaky	0	NTG
178	phe$^-$	0	NTG
180	WT	0	NTG
181	arg$^-$, leaky	0	NTG
182	gua$^-$, leaky	0	NTG
183	ura$^-$, Mel$^-$	50	MOP
185	ura$^-$,	50	MOP
189	ura$^-$, rib, leaky	50	MOP
190	ura$^-$	50	MOP
194	ura$^-$, met$^-$	50	MOP
197	pro$^-$, met$^-$, leaky	10	MOP
199	pro$^-$, ade$^-$, gua$^-$	10	MOP
202	pro$^-$, thia$^-$	10	MOP
205	pro$^-$, unbekannte Auxotrophie	10	MOP
208	pro$^-$, arg$^-$	10	MOP
216	ura$^-$, met$^-$	172	MOP
217	ura$^-$	172	MOP
219	ura$^-$, thia$^-$, leaky	172	NTG
220	ura$^-$, gua$^-$	172	NTG

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Stamm	Marken	Elter	Entstehung
901/221	WT	172	NTG
222	WT	172	NTG
244	ura$^-$, thia$^-$	172	NTG
251	ura$^-$, ade$^-$, gua$^-$	172	NTG
256	ura$^-$, Rif^{res}	172	Rif
262	FT^{res}	8c	FT
263	FT^{res}	8c	FT
269	his$^-$, Mel$^+$	23	MOP
273	ura$^-$, his$^-$	172	MOP
274	ura$^-$, met$^-$	172	MOP
275	ura$^-$, thia$^-$	172	MOP
277	ura$^-$, thia$^-$	172	MOP
282	his$^-$, leu$^-$, val$^-$, ade$^-$, gua$^-$	23	MOP
292	his$^-$, ura$^-$	172	MOP
295	ura$^-$ (Orotsäurephospho-ribosyltransferase$^-$), ile$^-$, val$^-$,	8c	NTG
296	bio$^-$	8c	NTG
297	pant$^-$, leaky	8c	NTG
298	met$^-$	8c	NTG
302	cys$^-$	8c	NTG

3.3.2. Suche nach Mutanten mit veränderter Nikkomycinsynthese

Eine große Anzahl von Stoffwechselmutanten wurde auf dem Medium M4 nach der unter 2.6.1. beschriebenen Methode auf ihre Nikkomycinproduktion untersucht. Abb. 5 gibt das Verhältnis von nach 5 Tagen produziertem Nikkomycin Z:X verschiedener Stoffwechselmutanten wieder.

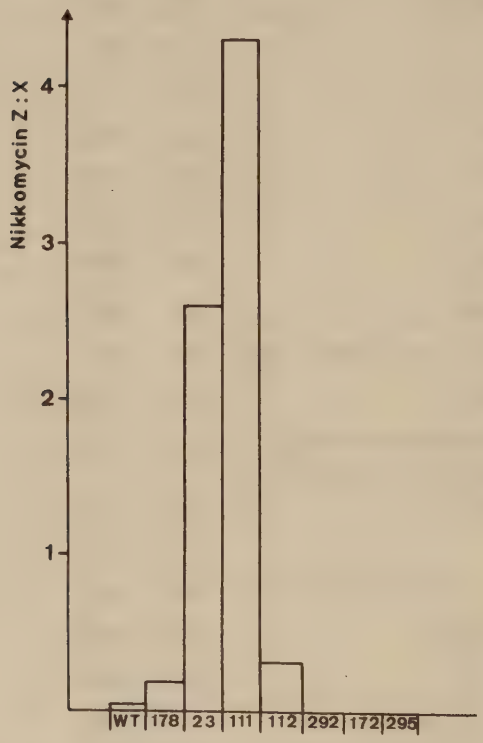


Abb. 5: Verhältnis der Nikkomycin Z:X Produktion (5. Tag) verschiedener Mutanten.

Die Mutanten mit einem Block in der Histidinbiosynthese (901/ 7, 23, 99, 111) produzieren im Vergleich zum Wildtyp erheblich weniger Nikkomycin X, jedoch vergleichbare Mengen an Nikkomycin Z. Die Mutante 901/112, die aus dem Stamm 901/111 durch Reversion der his^- Marke entstanden ist, zeigt wieder ein normales Nikkomycin Z:X Verhältnis. Die Doppelmutante 901/292 produziert kein Nikkomycin Z und nur noch Spuren von Nikkomycin X. Die Mutanten 901/172 (ura^-) und 901/295 (ura^-, ile^-, val^-) produzieren nur noch Nikkomycin X. Einfachmutanten mit dem Block im Phenylalanin-, Tryptophan-, Arginin-, Prolin-, Methionin-, Thiamin-, Biotin-, Pyridoxin-, Nicotinamid-, Guanin- und Cytosinstoffwechsel zeigen auf dem Medium M4 im Vergleich zum Wildtyp kein verändertes Nikkomycin Z:X Verhältnis.

3.3.2.1. Selektive Produktion der Nikkomycine mit 4-Formyl-4-imidazolin-2-on als Nukleobase

Tü 901/172 (ura$^-$) produziert auf dem Medium M4 nur Nikkomycine mit der 4-Formyl-4-imidazolin-2-on Nukleobase. Durch Zufütterung von Uracil (2 g/l) werden wieder Nikkomycine mit Uracil als Nukleobase gebildet.

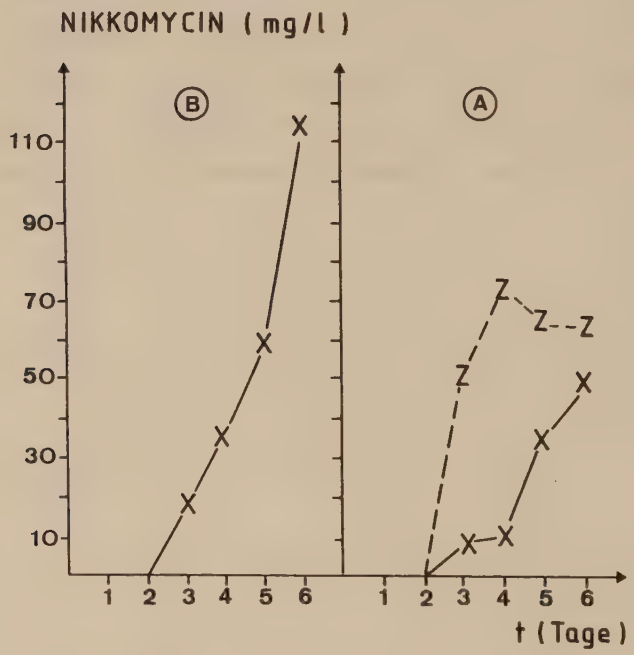


Abb. 6: Produktion von Nikkomycin X und Z durch Tü 901/172 auf M4-Medium mit (A) und ohne (B) Uracil-Zugabe
—— X: Nikkomycin X; ---- Z: Nikkomycin Z

3.3.2.2. Selektive Produktion der Nikkomycine mit Uracil als Nukleobase

Die Mutante 901/23 (his^-) produziert bei Zugabe von $\geq$ 1 g/l Uracil auf dem Medium M4 nur Nikkomycine mit Uracil als Nukleobase.

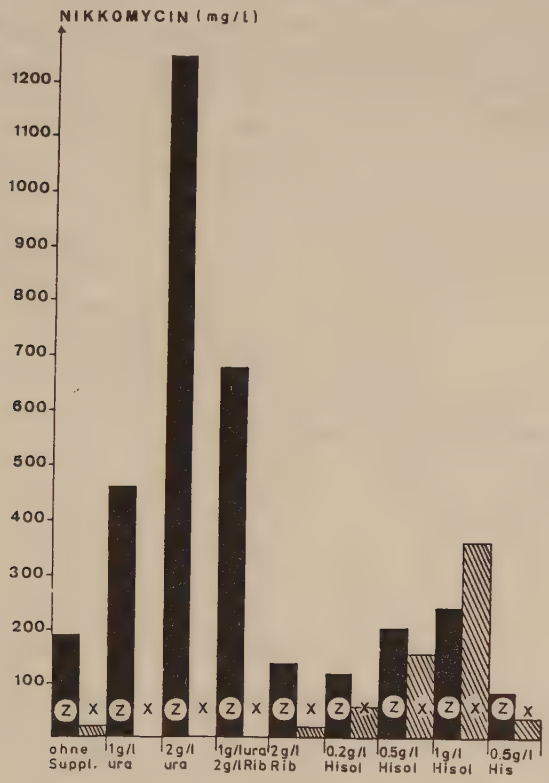


Abb. 7: Wirkung verschiedener Supplemente auf die Produktion von Nikkomycin X bzw. Z durch die Mutante 901/23 (5. Tag)

X: Nikkomycin X Z: Nikkomycin Z

Bei gleichzeitiger Verfütterung von 2 g/l D-Ribose und 1 g/l Uracil kommt es zu einer weiteren Steigerung der Nikkomycin Z-Produktion, im Vergleich zur Einzelverfütterung mit 1 g/l Uracil, Ribose allein führt zu keiner Steigerung. Durch Supplementierung mit 0,5 g/l Histidin wird die Nikkomycin Z-Produktion gehemmt, die Nikkomycin X-Produktion steigt leicht an. Bei Verfütterung von Histidinol, einer Histidinvorstufe, wird die Nikkomycin X-Produktion stark stimuliert.

3.3.3. Nikkomycin-Produktion in einem Resting-Cell System

Um die Abhängigkeit der Nikkomycin Z- und X-Produktion von einzelnen Supplementen besser beobachten zu können, wurde als Testanordnung das unter 2.6.2.1. beschriebene RC-System verwendet. Die Abb. 8 und 9 zeigen, daß der pH-Wert und das Trockengewicht des Stamms 901/23 bei unterschiedlicher Supplementation konstant bleiben. Dies bedeutet, daß die Nikkomycin-Produktion nur durch die genetische Marke und das Supplement beeinflußt wird.

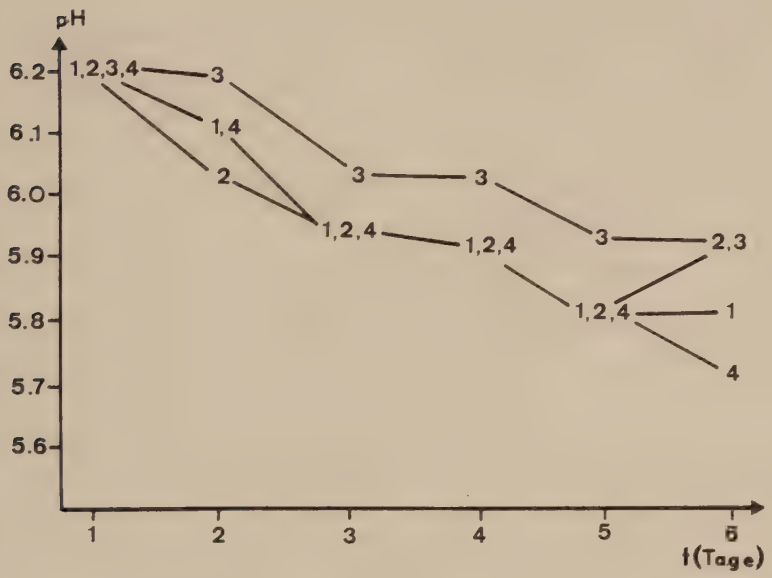


Abb. 8: Abhängigkeit des pH-Wertes von verschiedenen Supplementen für die Mutante 901/23 auf RC-Medium. (1) 0,2 g/l ura, (2) 0,02 g/l hisol, (3) ohne Supplement, (4) 0,02 g/l his

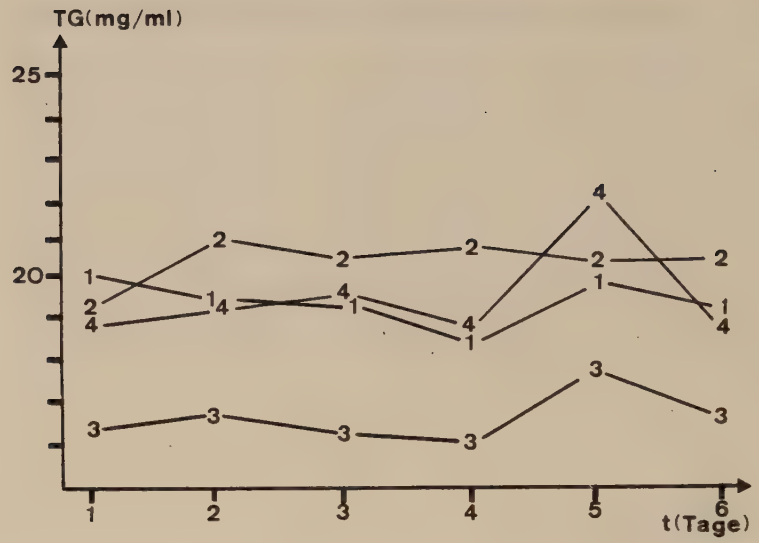


Abb. 9: Abhängigkeit des Trockengewichtes von verschiedenen Supplementen für die Mutante 901/23 auf RC-Medium. (1) 0,2 g/l ura, (2) 0,02 g/l hisol, (3) ohne Supplement, (4) 0,02 g/l his

3.3.3.1. Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/23 (his⁻)

Aus Abb. 10 geht hervor, daß der Stamm 901/23 in seiner Nikkomycin X-Produktion am stärksten durch Histidinol stimuliert wird. Der Zusatz von Tryptophan senkt die Nikkomycinproduktion. Uracil-, Adenin-, Phenylalanin-, Histidin- und Isoleucinzugabe führen zu keiner nennenswerten Zunahme der Produktion von Nikkomycin X. Uracil stimuliert als einziges Supplement die Nikkomycin Z-Produktion.

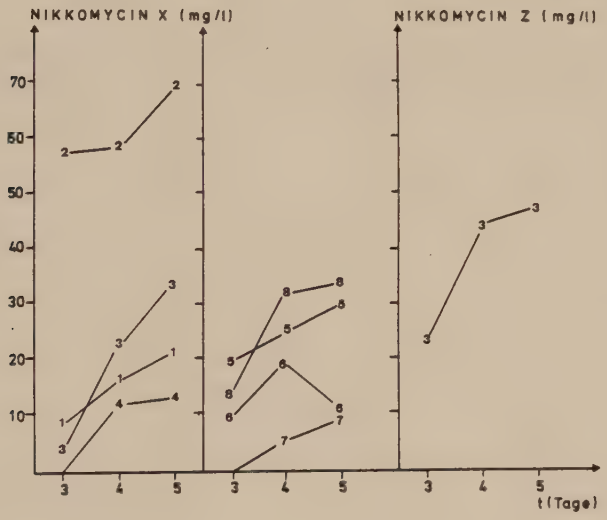


Abb. 10: Produktion von Nikkomycin Z bzw. X durch Tü 901/23 auf RC-Medium unter dem Einfluß verschiedener Supplemente

1 : 5 mM ile, 2 : 5 mM hisol, 3 : 5 mM ura,
4 : 5 mM his, 5 : 5 mM ade , 6 : ohne Supplement
7 : 5 mM trp, 8 : 5 mM phe

3.3.3.2. Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/157 (ade⁻)

Die Supplementation mit Histidinol bzw. Adenin führt bei Tü 901/157 zur stärksten Stimulation der Nikkomycin X-Produktion. Bei Zugabe von Tryptophan liegt die Nikkomycin X-Produktion unter der Kontrolle (ohne Supplement). Die Verfütterung von Isoleucin, Uracil, Histidin und Phenylalanin führt zu keiner nennenswerten Nikkomycin X Produktionssteigerung. Nikkomycin Z wird nur in Anwesenheit von Uracil gebildet.

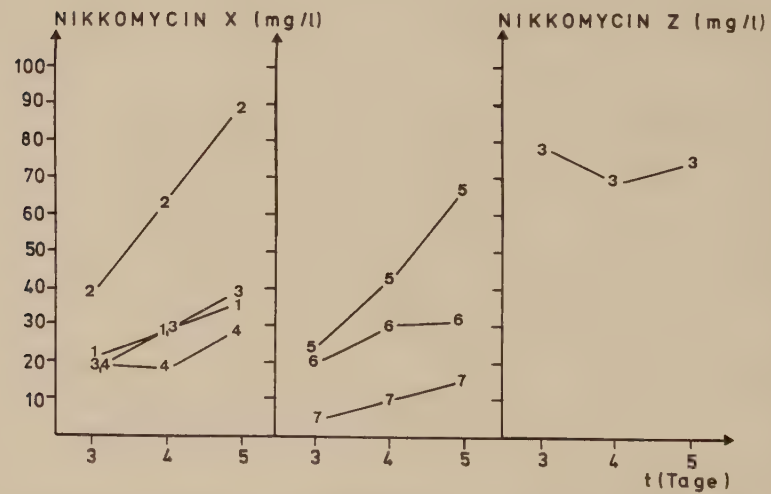


Abb. 11: Produktion von Nikkomycin Z bzw. X durch Tü 901/157 auf RC-Medium unter dem Einfluß verschiedener Supplemente.
1 : 5 mM ile, 2 : 5 mM hisol, 3 : 5 mM ura, 4 : 5 mM his, 5 : 5 mM ade, 6: ohne Supplement, 7 : 5 mM trp,

3.3.3.3. Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/112 (trp⁻)

Wie aus Abb. 12 hervorgeht, bewirkt die Zugabe von Isoleucin bzw. Histidinol die stärkste Stimulation der Nikkomycin X-Produktion. Tryptophan hemmt die Nikkomycin X-Synthese. Histidin-, Uracil-, Adenin- und Phenylalaninzusatz stimulieren die Produktion von Nikkomycin X nicht. Nikkomycin Z wird nur bei Anwesenheit von Uracil gebildet.

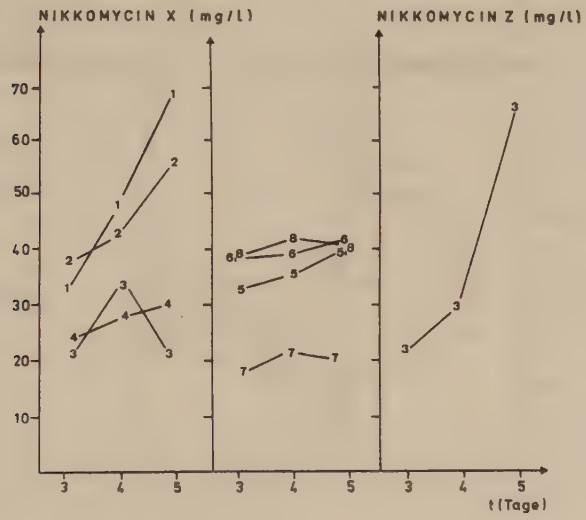


Abb. 12: Produktion von Nikkomycin Z bzw. X durch Tü 901/112 auf RC-Medium unter dem Einfluß verschiedener Supplemente.
1 : 5 mM ile, 2 : 5 mM hisol, 3 : 5 mM ura,
4 : 5 mM his, 5 : 5 mM ade, 6 : ohne Supplement,
7 : 5 mM trp, 8 : 5 mM phe

3.3.3.4. Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/178 (phe$^-$)

Abb. 13 zeigt, daß Isoleucin bzw. Histidinol die Nikkomycin X-Produktion am stärksten stimuliert. Die Supplementierung mit Uracil, Histidin, Adenin und Tryptophan führt zu keiner Steigerung der Nikkomycin X-Produktion. Nikkomycin Z wird nur bei Uracil-Zugabe gebildet.

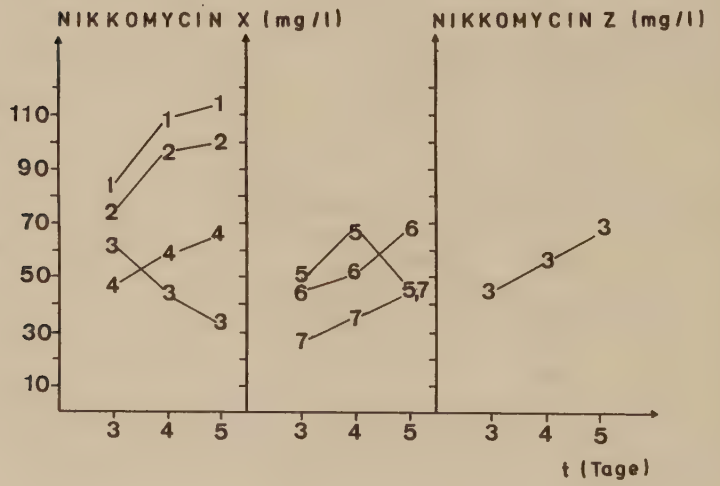


Abb. 13: Produktion von Nikkomycin Z bzw. X durch Tü 901/178 auf RC-Medium unter dem Einfluß verschiedener Supplemente
1 : 5 mM ile, 2 : 5 mM hisol, 3 : 5 mM ura,
4 : 5 mM his, 5 : 5 mM ade, 6 : ohne Supplement,
7 : 5 mM trp, 8 : 5 mM phe

Die Verfütterungsexperimente mit Einfachmutanten zeigen, daß alle getesteten Stämme durch Uracil-Zugabe zur Nikkomycin Z-Produktion und durch Histidinol-Zugabe zur Nikkomycin X-Produktion stimuliert werden können.

Nikkomycin X und Z unterscheiden sich strukturell nur in ihren Basen, die nach einer Hypothese von URAMOTO et al. (1980) biogenetisch auseinander hervorgehen sollen. Mit Doppelmutanten soll geklärt werden, ob bei defekter Uracilbiosynthese der Stimulationseffekt der Nikkomycin X-Produktion durch Histidinol noch beobachtet werden kann.

3.3.3.5. Verfütterungsversuche mit der Mutante 901/292 (ura⁻, his⁻)

Die Supplementation mit Histidinol führt bei der Doppelmutante 901/292 zur höchsten Nikkomycin X-Produktion. Die Zugabe von Histidin, Adenin und Phenylalanin stimuliert die Nikkomycin X-Produktion schwach. Isoleucin, Uracil und Tryptophan hemmen die Nikkomycin X-Synthese. Uracil ermöglicht als einziges Supplement die Nikkomycin Z-Synthese.

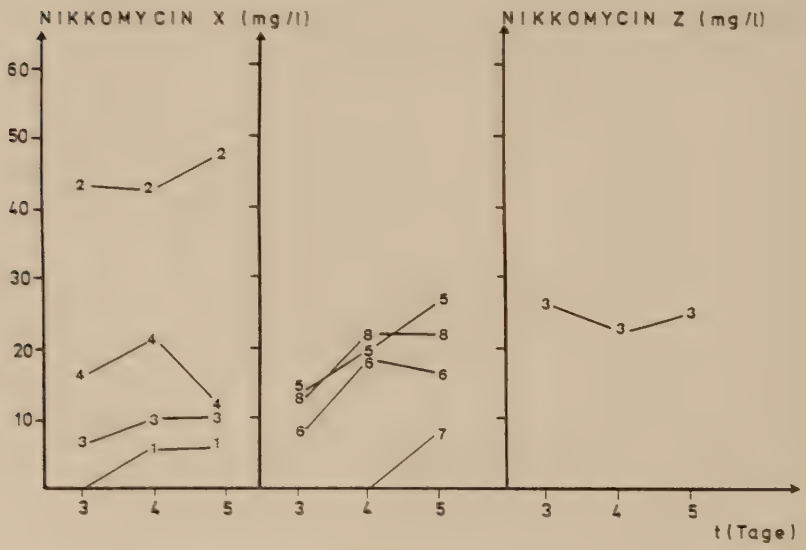


Abb. 14: Produktion von Nikkomycin Z. bzw. X durch Tü 901/292 auf RC-Medium unter dem Einfluß verschiedener Supplemente.
1 : 5 mM ile, 2 : 5 mM hisol, 3 : 5 mM ura,
4 : 5 mM his, 5 : 5 mM ade, 6 : ohne Supplement,
7 : 5 mM trp, 8 : 5 mM phe

3.3.3.6. Verfütterungsexperiment mit der Mutante 901/251 (ura$^-$, pur$^-$)

Die Zufütterung von Histidinol führt bei der Doppelmutante 901/251 zu einer starken Stimulierung der Nikkomycin X-Produktion. Die Zugabe von Isoleucin, Uracil, Histidin, Adenin und Phenylalanin stimuliert schwach die Nikkomycin-X-Synthese, Tryptophan hemmt sie. Uracil ermöglicht als einziges Supplement die Nikkomycin Z-Produktion.

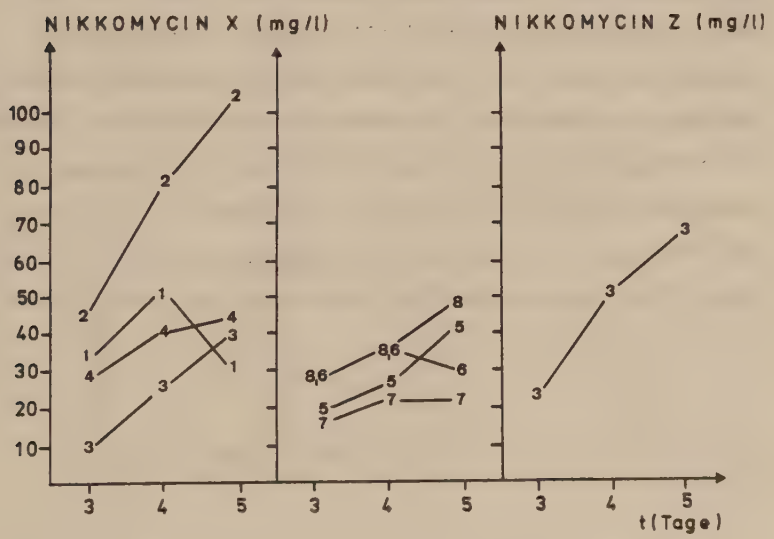


Abb. 15: Produktion von Nikkomycin Z bzw. X durch Tü 901/251 auf RC-Medium unter dem Einfluß verschiedener Supplemente.
1 : 5 mM ile, 2 : 5 mM hisol, 3 : 5 mM ura,
4 : 5 mM his, 5 : 5 mM ade, 6 : ohne Supplement,
7 : 5 mM trp, 8 : 5 mM phe

3.3.3.7. Kombinationsverfütterung mit der Mutante 901/23 (his^-)

Durch gleichzeitige Zugabe von Histidin und Histidinol zum RC-Medium wurde der Stamm 9o1/23 nur schwach zur Produktion von Nikkomycin X angeregt. Die größte Steigerung der Nikkomycin X-Produktion erfolgte durch Supplementation mit Histidinol und den Kombinationen von Isoleucin/Histidinol und Uracil/Histidinol. Die Verfütterung von Histidin, Uracil und Uracil/Isoleucin führt zu keiner merklichen Steigerung der Nikkomycin X-Produktion. Nikkomycin Z wurde nur auf Medien gebildet, die Uracil allein oder in Kombination enthielten. Keine der Kombination mit Uracil bzw. Histidinol führte im Vergleich zur Einzelverfütterung zu einer Steigerung der Nikkomycin Z bzw. X Produktion (Abb. 16). Bei der Kombinationsverfütterung von Uracil/Histidinol wurde sowohl die Nikkomycin X-, wie auch die Nikkomycin Z-Synthese stimuliert. Die Konzentration der Supplemente im RC-Medium betrug 10 mM.

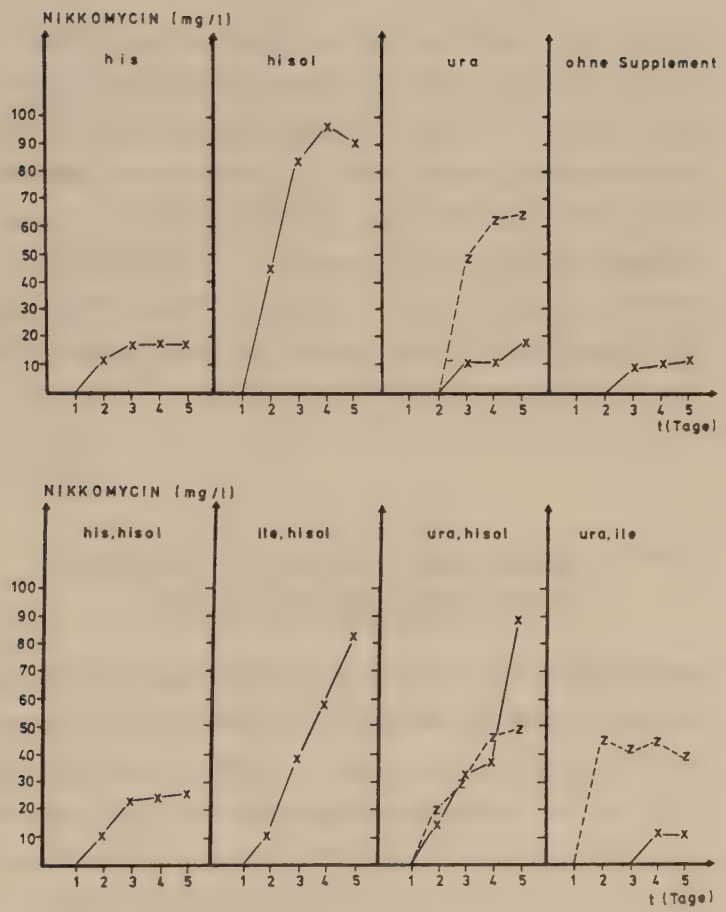


Abb. 16: Produktion von Nikkomycin X bzw. Z durch Tü 901/23 unter dem Einfluß verschiedener Supplemente

——X: Nikkomycin X

---Z: Nikkomycin Z

3.3.4. Leucin-, Isoleucin-, Valin-Effekt

KURTH (1981) fand, daß die verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin die Produktion der Nikkomycine stimulieren. Die Verfütterungsexperimente mit Einfach- und Doppelmutanten zeigten, daß die Zugabe dieser Aminosäuren zum Produktionsmedium keine einheitliche Stimulation der Nikkomycinproduktion verursachte. Es lag deshalb nahe, nach Mutanten zu suchen, die in der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren blockiert waren, um deren Notwendigkeit für die Nikkomycinproduktion zu zeigen.

3.3.4.1. Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/282 (val^-, leu^-, his^-, pur^-)

Abb. 17 zeigt die Wirkung von Supplementen im RC-Medium auf die Produktion von Nikkomycin X durch den Stamm 901/282 am 5. Tag. Die Konzentration an Histidin und Adenin betrug 1 mM, die der übrigen Verbindungen 10 mM. Die Kombination von (Valin, Leucin, Histidin und Adenin), (Isoleucin, Histidin und Adenin), (Valin, Histidin und Adenin), (Threonin, Histidin und Adenin), (Histidin), (Leucin, Histidin und Adenin) und (Adenin) bewirkt keine Steigerung der Nikkomycin X-Synthese. Nur die Kombination von (Histidinol, Histidin und Adenin) führt zu einer Steigerung der Nikkomycin X-Produktion.

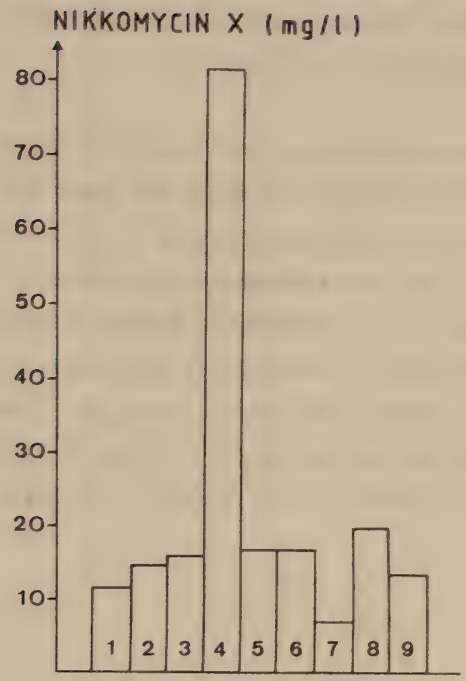


Abb. 17: Wirkung verschiedener Supplemente auf die Produktion von Nikkomycin X durch die Mutante 901/282 (5. Tag)

(1)	val,	his, ade
(2)	ile,	his, ade
(3)	val, leu,	his, ade
(4)	hisol,	his, ade
(5)		his, ade
(6)		ade
(7)	thr,	his, ade
(8)	leu,	his, ade
(9)		his

3.3.4.2. Verfütterungsexperimente mit der Mutante 901/295 (ile$^-$, val$^-$, ura$^-$)

Abb. 28 zeigt die Wirkung von Supplementen im RC-Medium auf die Produktion von Nikkomycin X durch den Stamm 901/295 am 5. Tag. Die Uracil-Konzentration betrug 1 mM, die der übrigen Substanzen 10 mM. Die Kombination von Isoleucin, Valin und Uracil stimuliert die Nikkomycin X-Produktion am stärksten. (Valin und Uracil), (Histidinol und Uracil), (Threonin und Uracil), (Leucin und Uracil) und Uracil führen zu keiner nennenswerten Steigerung der Nikkomycin X-Produktion. Die Synthese von Nikkomycin Z wird durch 1 mM Uracil nicht ermöglicht.

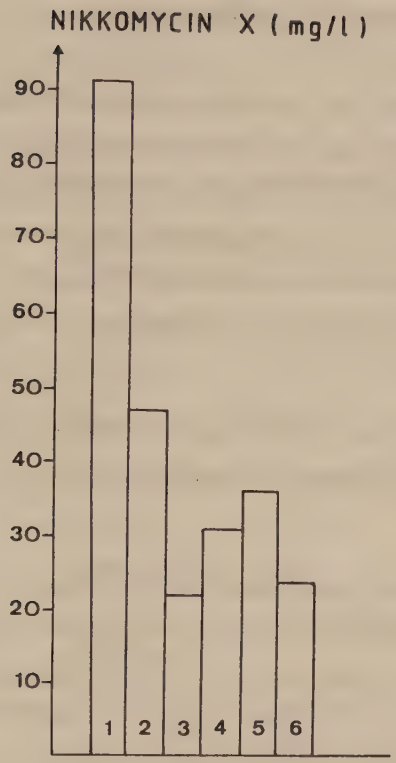


Abb. 18: Wirkung verschiedener Supplemente auf die Produktion von Nikkomycin X durch die Mutante 901/295 (5. Tag)

(1) ile, val, ura

(2) val, ura

(3) ura

(4) hisol, ura

(5) thr, ura

(6) leu, ura

3.4. Suche nach neuen Sekundärmetaboliten

Da durch Mutation nicht nur die Produktionshöhe beeinflußt sein kann, sondern auch die Struktur des Metaboliten, wurden zahlreiche Mutanten auf die Bildung neuer Peaks in der HPLC-Analyse untersucht. Die Wellenlänge des Detektors des HPLC-Systems (290 nm) sollte selektiver Nukleosid-strukturen erfassen, so daß die Hoffnung groß ist neue Nikkomycine zu finden.

Eine Medienvariation führte beim Stamm Tü 901 zu Produkten, die unterschiedliche Antibiotikaklassen angehören (LANGHÄRIG, 1978).

Kulturfiltrate von Auxotrophiemutanten des Stammes Tü 901 wurden, wie unter 2.6.1 beschrieben, mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie auf zum WT unterschiedliche Nikkomycinmuster untersucht. In Tabelle 5 sind die Mutanten, deren HPLC-Diagramme Extrapeaks aufweisen, aufgeführt.

Tabelle 6: Extrapeaks im HPLC-Elutionsdiagramm der Nikkomycine.

Stamm	Lage der Extrapeaks im HPLC-Elutionsdiagramm
901/111	Peak α zwischen Nikkomycin D und den Nikkomycinen Z/X; Peak β nach Nikkomycin I
901/205	Peak α zwischen Nikkomycin D und den Nikkomycinen Z/X
901/115	Peak β nach Nikkomycin I
901/ 8	zwei Extrapeaks zwischen Nikkomycin Z/X und I
901/ 95	Doppelpeak bei Nikkomycin I
901/167	Extrapeak zwischen Nikkomycin D und den Nikkomycinen Z/X

Diese Extrapeaks sind Gegenstand weiterer Untersuchungen

3.5. Suche nach Regulationsmutanten in der Histidinbiosynthese

Die Hinweise, daß die Imidazolbase der Nikkomycine sich von einem Zwischenprodukt der Histidinbiosynthese ableitet, ließen es sinnvoll erscheinen, diese zu deregulieren. Ziel dieser Experimente war, über eine Steigerung der Histidinsynthese die Produktion der imidazolhaltigen Nikkomycine zu erhöhen.

DERKOS-SOJAK et al. (1977) beschrieben für Streptomyces coelicolor eine Methode, um die Histidinbiosynthese zu deregulieren. In Abb. 20 ist die Methode schematisch aufgezeichnet.

		wünschenswerte Eigenschaften:
Test gegen:	2-Thiazolalanin	sensitiv
	L-2,4 Diaminobuttersäure	sensitiv
	1,2,4 Triazolalanin	resistent

Abb. 20: Methode der Deregulation der Histidinbiosynthese nach DERKOS-SOJAK et al. (1977).

Revertanten von his⁻ Mutanten von Tü 901 und der Wildtyp wurden auf M2 Testplatten gegen 5 mM 2-Thiazolalanin, L-2,4 Diaminobuttersäure und 1,2,4 Triazolalanin getestet. Der Stamm Tü 901 wurde durch 2-Thiazolalanin und L-2,4 Diaminobuttersäure in seinem Wachstum nicht beeinträchtigt. 1,2,4 Triazolalanin führte zu einer unvollständigen Hemmung des Wachstums. Die Wachstumshemmung konnte wie unter 2.4.3. beschrieben im Kreuztest durch L-Histidin

kompetitiv, durch Histidinol nicht kompetitiv aufgehoben werden. Da das Wachstum durch den Antagonisten nicht vollständig unterdrückt wurde, wurde als Selektionsmethode für Resistente die unter 2.4.4. beschriebenen Gradientenplatten verwendet. Diejenigen Klone, die sich als die resistentesten erwiesen, wurden mit der unter 2.6.1. beschriebenen Methode auf ihre Nikkomycinproduktion im Schüttelkolben getestet. Keine dieser Revertanten produzierte mehr Nikkomycin X als die Mutante 901/178 (332 mg/l Nikkomycin X).

α-Methylhistidin, 3-Amino-1,2,4-Triazol und D-Histidinmonohydrochlorid sind Verbindungen, die bei der Untersuchung der Regulation der Histidinbiosynthese in Bakterien und Hefen ebenfalls verwendet wurden (SCHLESINGER und MAGASANIK, 1964; Yep, 1975). Diese Verbindungen zeigten, wie auch die Urocaninsäure, einem Abbauprodukt des Histidins, keine Wirkung auf das Wachstum des Stamms Tü 901.

3.6. Suche nach Antibiotika-Resistenzmutanten

Nach der unter 2.4.1.5. beschriebenen Methode wurden Antibiotika-Resistenzmutanten isoliert. Für ein genetisches Arbeiten eignen sich nach HOPWOOD (1970) folgende Antibiotikaresistenten: Streptomycin-, Neomycin-, Novobiocin-, Rifampicin- und Tetracyclin-Resistenz.

Der Stamm Tü 901 zeigte eine spontane Mutationsrate von ca. 10^{-8}, die zur Resistenz gegen Streptomycin und Rifampicin führte. Gegen die Antibiotika Novobiocin, Neomycin und Tetracyclin zeigt sich der Stamm empfindlich, jedoch lag die spontane Mutationsrate zur Resistenzbildung so niedrig, daß diese Marken nicht für genetische Rekombinationsversuche geeignet sind.

4. D I S K U S S I O N

4.1. Biogenese der Basen in den Nikkomycinen

4.1.1. Überlegungen zur Biogenese von Nikkomycin C

Die Mutante 901/172 (ura$^-$) bildet auf dem Medium 4 nur noch Nikkomycine mit C_x als Nukleosid. Dies läßt sich damit erklären, daß bei Beginn der Nikkomycin X-Produktion kein freies Uracil mehr im Medium ist (DELZER, 1980). Durch Verfütterung mit Uracil konnte das Produktionsspektrum zugunsten der Nikkomycine mit Uracil als Base verschoben werden. Diese Verschiebung konnte bei allen getesteten Stämmen beobachtet werden. Die Menge an Uracil, die zu einer vollständigen Verschiebung zu den uracilhaltigen Nikkomycinen führte, schwankte zwischen 8 und 35 mM, je nach Medium und verwendeter Stoffwechselmutante. Die kombinierte Verfütterung von D-Ribose und Uracil führte zu einer weiteren Steigerung der Nikkomycin Z-Produktion. Diese Verfütterungsergebnisse stehen im Einklang mit der Biosynthese von Polyoxin C (ISONO et al., 1978). Da UMP und PEP die Vorstufen des Nukleosids der Polyoxine sind, muß man auch für die Synthese von Nikkomycin C einen Mechanismus fordern, der Uracil in sein entsprechendes Nukleotid umwandelt. Bei E. coli gibt es eine Reaktion, die Uracil beim Eintransport in die Zelle über den Mechanismus der Gruppentranslokation in UMP umwandelt (HOCHSTADT-OZER, 1971). Der Konfigurationsvergleich von "natürlichem" Nikkomycin C mit dem durch Uracilver-

fütterung erhaltenem Nikkomycin C ergab für beide übereinstimmend die Konfiguration eines β-Glycosids der Allose (KÖNIG, 1981).

Das Uracil der Nikkomycine stammt aus der primären Synthese der Pyrimidine. Die Orotsäurephosphoribosyltransferase$^-$ Mutanten 901/158 und 901/295 bilden nach Orotsäurezugabe kein Nikkomycin Z, jedoch nach Uracilzugabe. Der Stamm 901/172 mit einer defekten Orotsäurereduktase produziert sowohl mit Orotsäure wie mit Uracil wieder Nikkomycin Z.

4.1.2. Überlegungen zur Biogenese von Nikkomycin C_x

Die 5-Ringbase der Nikkomycine leitet sich vom L-Histidinol ab, einem Zwischenprodukt der Histidinbiosynthese. Sie entsteht also nicht über eine Ringkontraktion aus dem Uracilnukleosid, wie es URAMOTO et al. (1980) vermuten. Folgende Tatsachen sprechen gegen ihre Hypothese:

1. Die Mutante 901/172 (ura$^-$) produziert nur Nikkomycine mit C_x als Nukleosid.

2. Alle getesteten Mutanten bilden ohne Uracilzugabe auf dem RC-Medium nur Nikkomycine mit C_x als Nukleosid.

3. Durch hohe Konzentrationen an Uracil wird die Bildung von Nikkomycinen mit dem Nukleosid C_x auf dem Medium 4 vollständig unterdrückt, die Synthese der uracil-haltigen Nikkomycine jedoch stimuliert.

4. Alle Histidin$^-$ Mutanten zeigen auf dem Medium 4 ein stark verschobenes Nikkomycin Z:X Produktionsverhältnis im Vergleich zu allen anderen getesteten Stämmen.

5. Eine Revertante des Stamms 901/111 (his$^-$, trp$^-$) zu 901/112 (trp$^-$) zeigt wieder ein "normales" Z:X Verhältnis

6. Die Mutante 901/157 (ade$^-$) wird durch Adenin Verfütterung zum RC-Medium zur Produktion von Nikkomycin X stimuliert. Adenosintriphosphat, 5'-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat und Glutamin sind Vorstufen der Histidinbiosynthese (LEHNINGER, 1975).

7. Die Zugabe von L-Histidinol stimuliert bei allen 901 Stämmen die Produktion von Nikkomycin X.

8. Die Doppelmutanten 901/292 (ura$^-$, his$^-$) und 901/251 (ura$^-$, pur$^-$) produzieren je nach Supplementierung Nikkomycin Z oder X.

9. Die Kombinationsverfütterung von Uracil und L-Histidinol zum RC-Medium führt unabhängig voneinander zur Stimulation von Nikkomycin Z und X.

10. KÖNIG (1981) fand, daß Nikkomycin C_x α-Glycosid der Talose ist, im Gegensatz zum Nikkomycin C, welches ein β-Glycosid der Allose darstellt.

11. Hohe Konzentrationen an L-Histidin hemmen die Nikkomycin X-Produktion, ohne wachstumshemmende Eigenschaften zu besitzen. Dies kann durch die Regulation

der Synthese bedingt sein. Bei Salmonella typhimurium wird der erste Schritt der Histidin-Synthese durch ein allosterisches Enzym, die ATP-Phosphoribosyltransferase, katalysiert. Es wird durch Histidin gehemmt. In Anwesenheit eines Überschusses von Histidin im Kulturmedium wird die Synthese aller an der Histidinsynthese beteiligten Enzyme unterdrückt (koordinierte Repression) (BRENNER und AMES, 1971).

Die Kombination von je 10 mM L-Histidin und L-Histidinol als Supplement zu RC-Medium führt zu einer sehr schwachen Stimulation der Nikkomycin X-Synthese. Dies läßt sich folgendermaßen erklären.

1. Die Enzyme, die an der Modifikation des L-Histidinols zur 4-Formyl-4-imidazolin-2-on-Base der Nikkomycine beteiligt sind, werden auch durch Histidin reguliert.

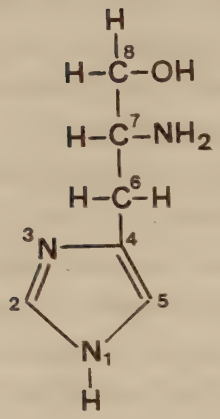
2. Die Carboxylgruppe des Histidins entsteht über eine zweistufige Oxidation des α-Aminoalkohols Histidinol.

   Diese Reaktion wird soweit bekannt von einem einzigen Enzym der Histidinol-Dehydrogenase katalysiert, im Gegensatz zu fast allen anderen Aminosäuren, deren Carboxylgruppen aus den entsprechenden α-Ketosäuren entstehen (LEHNINGER, 1975). Wenn nun nicht das Histidinol, sondern das Folgeprodukt Histidinal die Abzweigestelle ist, dann erfolgt die Regulation via Histidin noch in der normalen Kette der Histidinbiosynthese.

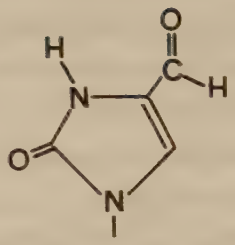
Dieser Mechanismus der Hemmung ist auch für andere Antibiotika bekannt. Hohe Konzentrationen an L-Lysin hemmen über einen Feedbackmechanismus die Bildung von Penicillin durch Penicillium chrysogenum (GOULDEN und CHATTAWAY, 1968; MARTIN, 1978) und Cephalosporin durch Paecilomyces persicinus (D'AMATO und PISANO, 1976). Die Penicillinbiosynthese zweigt auf der Stufe der α-Aminoadipinsäure von der Lysinbiosynthese ab. Lysin hemmt die Homocitrat-Synthase, das erste Enzym der Lysinbiosynthese (DEMAIN und MASUREKAR, 1974).

Bei E. coli ist die 4-Schritt Umwandlung von Imidazolglycerinphosphat zum Histidin nur in eine Richtung möglich (MAHLER und CORDES, 1969).
Unter der Voraussetzung, daß bei Tü 901 die Histidinsynthese in gleicher Weise abläuft, lassen sich die übrigen imidazolhaltigen Zwischenverbindungen als direkte Vorstufe des 5-Ringnukleosids der Nikkomycine ausschließen.
Die Umwandlung des L-Histidinols zum 4-Formyl-4-imidazolin-2-on macht mindestens folgende Veränderung notwendig (Abb. 21)

1. Transaminierung an C-7
2. oxidative Abspaltung von C-7 und C-8 als C_2-Körper
3. Oxidation von C-2



(1)



(2)

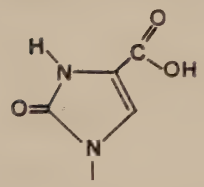
Abb. 20: Strukturvergleich von L-Histidinol (1) mit 4-Formyl-4-imidazolin-2-on (2)

Da sich die Nukleoside C und C_x auch hinsichtlich der Aminosäuren unterscheiden, kann man annehmen, daß ein Enzym existiert, das die 5-Ringbase mit dem Zucker verbindet. In E. coli katalysiert die UMP-Phosphorylase die Verknüpfung von Uracil mit 5'-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat zum UMP (DALKE und MAGILL, 1979)

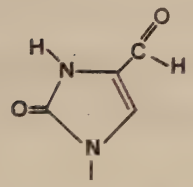
4.1.3. Vergleich der 5-Ringbase der Nikkomycine mit anderen natürlichen Nukleosidantibiotika

Bei diesem Vergleich werden nur Basen berücksichtigt, die keine Purine sind, und die zwei Stickstoffheteroatome im 5-Ring enthalten.

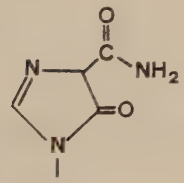
Strukturbestandteil von :



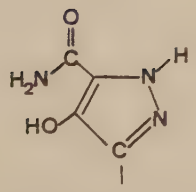
Neopolyoxin B



Nikkomycine B_x, X, J, N, C_x
Neopolyoxin A



Bredenin



Pyrazofurin

Die Base des von URAMOTO et al. (1980) beschriebene Neopolyoxins A ist identisch mit der aus dem Nikkomycin X. Die Base von Neopolyoxin B, die 2-Oxo-4-imidazolin-4-carbonsäure entsteht chemisch durch Oxidation des 4-Formyl-4-imidazolin-2-ons (KECKEISEN, 1979). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß der Biogeneseweg dieser Verbindung sich ebenfalls vom L-Histidinol ableitet. In vitro Tests an der Chitinsynthetase von Pyricularia oryzae zeigten, daß Neopolyoxin B weniger aktiv ist als Neopolyoxin A (KOBINATA et al., 1980).

Bredinin (4-Carbamoyl-1-β-D-ribofuranosylimidazolium-5-olat) ist ein aus Eupenicillium brefeldianum isoliertes Imidazolnucleosid (MIZUNO et al., 1974). Es ist ein Derivat des Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamids (PRAIC), einer Zwischenverbindung des Purinstoffwechsels und des Histidinstoffwechsels (Abb. 21).

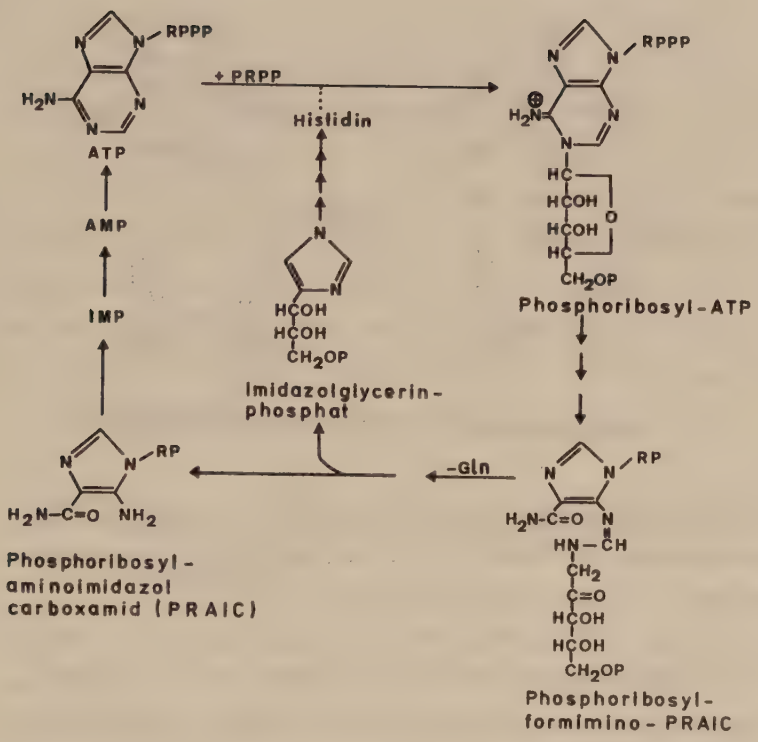
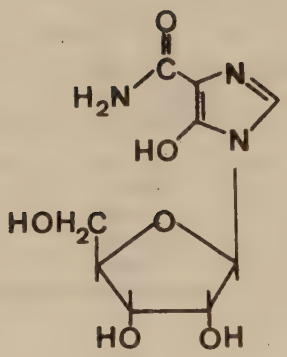


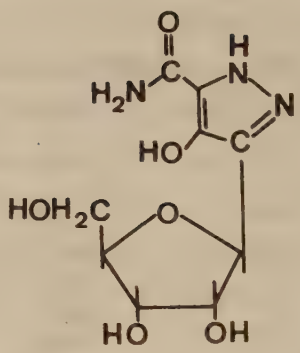
Abb. 21: Der Purin Nukleotid-Cyclus in der Histidinbiosynthese

(... Feedbackhemmung)

Die Produktion von Bredinin wird durch Adenin kompetitiv gehemmt. Durch Zusatz des Aglycons zu RC-Medien von E. brefeldianum wird Bredinin wieder synthetisiert (MIZUNO et al., 1975).



BREDININ



PYRAZOFURIN

Bredinin zeigt keine antibakterielle Wirkung, hemmt aber das Wachstum von Candida albicans, Vaccinia Virus und die Vermehrung verschiedener Zellinien in Kultur.

Strukturähnlich zum Bredinin ist Pyrazofurin (3-(1-β-D-Ribofuranosyl)-4-hydroxypyrazol-5-carboxamid) aus Kulturfiltraten von Streptomyces candidus (GERZON et al., 1969; WILLIAMS und HOEHN, 1974). Die Verbindung zeigt antivirale und Antitumoraktivität (SWEENEY et al., 1973).
Die Biosynthese wurde von BUCHANAN et al. (1980) aufgeklärt. D-Ribose und L-Glutamat sind Vorstufen der Biosynthese des Pyrazofurins.

4.2. Gezielte Produktion einzelner Nikkomycine

Die Schwierigkeiten, die bei der chromatographischen Trennung des Nikkomycin Z/X-Gemisches auftauchen (KECKEISEN, 1979), lassen sich durch die Kenntnis der unterschiedlichen Biogenese der Nukleobasen vermindern. Durch Zugabe von 35 mM Uracil beim Animpfen produziert der Wildtyp nur noch Nikkomycine mit Uracil als Nukleobase (KURTH, 1981). Unter uracillimitierenden Bedingungen, z.B. auf dem RC-Medium werden nur Nikkomycine mit der 5-Ringbase gebildet. Die Synthese von Nikkomycin X läßt sich durch Verfütterung von L-Histidinol stark stimulieren.

4.3. Überlegungen zu einer gezielten Produktionssteigerung

Da der Zusatz von Uracil bzw. L-Histidinol die Nikkomycinproduktion beeinflußt, ist es für eine Produktionssteigerung sinnvoll, den Stamm Tü 901 gezielt zu deregulieren. Eine Möglichkeit, die Ausbeute an Nikkomycinen zu steigern, ist der Einsatz von Uracil- bzw. Histidinantagonisten. Bestimmte Resistenzmutanten lassen einen erhöhten Durchsatz im gewünschten Stoffwechselweg und damit eine erhöhte Produktion der Nikkomycinvorstufen erwarten. Die Deregulation der Histidinbiosynthese beschreibt DERKOS-SOJAK et al. (1977). Diese Möglichkeit zur Produktionssteigerung kommt nur dann in Betracht, wenn bei Stimulierung der Histidinsynthese die gemeinsame Vorstufe,

L-Histidinol, für die Bildung der 4-Formyl-4-imidazolin-2-on Base abgezweigt werden kann. Eine zweite Möglichkeit, die Produktion von Nikkomycin X zu steigern, wäre die Suche nach einer Histidinoldehydrogenase$^-$ Mutante von Tü 901. Diese Mutante würde L-Histidinol nicht mehr in L-Histidin umwandeln können. Da die industrielle Produktion von Sekundärmetaboliten aus Kostengründen hauptsächlich auf Komplettmedien erfolgt, könnte eine solche Mutante zur Produktion von Nikkomycin X verwendet werden.

Als eine weitere Konsequenz aus den Supplementierungsstudien sollte man die Zusammensetzung des Produktionsmediums der Nikkomycine überdenken. Steigt das Interesse am Nikkomycin X, so sollte man ein Medium mit geringerem Nukleosidgehalt wählen.

Ein weiterer wichtiger Baustein für die Nikkomycinnucleoside ist die Furanose. Für die Polyoxine konnte ISONO et al. (1978) zeigen, daß Glucose über den Pentosephosphatcyclus in Ribose umgewandelt wird. Da für die Nikkomycin Z-Produktion eine Stimulierung durch Zugabe von D-Ribose beobachtet werden konnte, ist es sinnvoll, Mutanten von Tü 901 zu suchen, die einen erhöhten Pentosephosphatcyclus aufweisen. Dies ließe sich über Hemmstoffe der Glycolyse, z. B. Arenaemycin erreichen (HARTMANN et al., 1978). Ein anderer Weg ist die Suche nach Mutanten, die Pentosen anreichern. Eine Möglichkeit ist die Suche nach Mutanten, die im Pentosephosphatcyclus blockiert sind. Mutanten mit defekter Transketolase, D-Ribulose-5-phosphat-3-epimerase

oder D-Ribose-5-phosphat-ketolisomerase reichern D-Ribose an (SASAJIMA und YONEDA, 1974). Schwierigkeiten für die Nikkomycinproduktion durch eine solche Mutante könnten darin liegen, daß keine aromatischen Aminosäuren mehr gebildet werden können. Die Transketolaseaktivität ist für die Aromatenbiosynthese notwendig (GHISALBA und NÜESCH, 1978).

4.4. Variationsmöglichkeiten für die Nikkomycine

Das Auffinden neuer Antibiotika mit klassichen Methoden wird rein statistisch immer unwahrscheinlicher. Die Suche nach Mikroorganismen, die neue Antibiotika produzieren, war in den letzten zehn Jahren weniger erfolgreich, als in den Jahren zuvor. Eine steigende Anzahl von neuen Substanzen wurde zwar beschrieben, darunter war jedoch nur ein geringer Prozentsatz neuer Verbindungen, die für die Anwendung in Frage kommen" (LANCINI, 1980). Deshalb ist es sinnvoll sich mit Molekülstrukturen zu beschäftigen, deren Eigenschaften man kennt, um diese durch Modifikation "effektiver" zu machen. Dabei könnte effektiver bedeuten, daß die Verbindung eine breitere Wirksamkeit, größere Effektivität gegen resistente Organismen, größere Stabilität und reduzierte Toxizität aufweisen.

Varianten von Antibiotika lassen sich auf verschiedenen Wegen gewinnen:

1. Die Totalsynthese einer Struktur

2. Die chemische Modifikation des Antibiotikums, unter der Voraussetzung, daß freie funktionelle Gruppen chemisch zugänglich sind. Als bekanntestes Beispiel eines veränderten Antibiotikums sind die semisynthetischen Penicilline (KURYLOWICZ, 1976; STAHLMAN, 1979) zu nennen. Hier wurden vor allem auf drei Gebieten Verbesserungen erzielt:
   - erhöhte Wirksamkeit gegen Gram-negative Bakterien
   - erhöhte Stabilität gegen Säuren.
   - Stabilität gegen Penicillinasen. (FRANKLIN & SNOW, 1973)
3. Die biologische Modifikation des Antibiotikums durch Verfütterung neuer Vorstufen an den Antibiotikaproduzenten. 5-Fluor-,5-Brom- und 6-Azauracil führten bei Streptomyces cacaoi zu neuen Polyoxinen mit teilweise verändertem Wirkspektrum (ISONO et al., 1973; ISONO und SUHADOLNIK, 1976).
4. Modifikation durch Verfütterung neuer Vorstufen an Mutanten des Antibiotikaproduzenten. Diese Methode wird nach RINEHART (1977) als Mutasynthese bezeichnet und ist der Prozess, durch den ein Antibiotikaproduzent durch Mutation in einen Nichtproduzenten überführt wird. Dabei ist die Synthese der Gesamtstruktur oder mindestens einer Teilstruktur des Antibiotikums blockiert. Durch Verfütterung natürlicher oder synthetischer Vorstufen kann das natürliche oder neue Antibiotikum - Mutamycin - gebildet werden. Diese Methode

wurde erfolgreich bei der Variation der Aminoglycosid-aminocyclitol Antibiotika angewendet (DAUM und LEMKE, 1979; RINEHART ,1979).

Der Wildtyp ist aus zwei Gründen für die Produktion semisynthetischer Antibiotika weniger geeignet als eine entsprechende Mutante:

- da die semisynthetischen Verbindungen ein ähnliches Laufverhalten wie die natürlichen Antibiotika zeigen, ist die Isolierung erschwert.
- die Biosyntheseenzyme zeigen zum natürlichen Substrat eine höhere Affinität als zur neuen Vorstufe. Die Mutanten können diese jedoch nicht mehr bilden und damit entfällt die Konkurrenzreaktion. Es müßten, um den gleichen Einbau beim Wildtyp zu erzwingen, wesentlich höhere Konzentrationen an modifizierten Vorstufen angeboten werden.

Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, mit Mutanten des Stamms Tü 901 die Struktur des Nikkomycinmoleküls durch Mutasynthese zu variieren, dafür bieten sich z.B. ura^-, his^- Mutanten an.

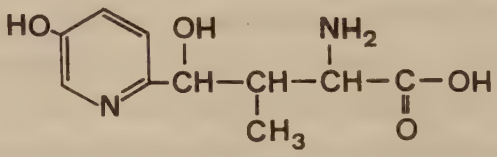
5. Die Modifikation einer Grundstruktur kann auch durch die Ausnutzung der physiologischen Möglichkeiten des Produzenten erreicht werden. Das Studium des Rifamycinproduzenten Nocardia mediterranei zeigte, daß durch Mutation neue Biosynthesevarianten des Rifamcinmoleküls erhalten werden konnten (MARTINELLI et al., 1978).

Die für die Nikkomycinreihe ausgearbeitete HPLC-Technik

(FIEDLER, 1981) ermöglicht die Suche nach solchen variierten Nikkomycinen.

4.5. Überlegungen zur Biogenese von Nikkomycin D

Bei dem Nikkomycin D handelt es sich chemisch um die α-Amino-β-methyl-γ-hydroxy-2'-(5-hydroxypyridyl)-buttersäure.



Aus den Biogeneseerfahrungen, die man bei einigen Peptidolactonantibiotika aus Streptomyceten, z. B. der Biosynthese des Pyridomycins (OGAWARA et al., 1968), gemacht hat, ist es sinnvoll, die Entstehung des aromatischen und des aliphatischen Teils von Nikkomycin D getrennt zu diskutieren.

4.5.1. Überlegungen zur Biogenese des Pyridinrings in den Nikkomycinen

Für die Biosynthese des Pyridinrings in höheren Pflanzen und in Mikroorganismen gibt es prinzipiell folgende Möglichkeiten:

1. Entstehung aus der Hydroxyanthranilsäure als Zwischenprodukt des Tryptophanabbaus und Ausgangsverbindung für die Nikotinsäuresynthese (FOSTER und MOAT, (1980).
2. Entstehung aus Dihydroxyacetonphosphat und Asparaginsäure, Ausgangsverbindungen für die Nikotinsäuresynthese bei einigen Bakterien und höheren Pflanzen. (FOSTER und MOAT, 1980).
3. Entstehung aus Formiat und Aspartat, den Vorstufen der Nikotinsäuresynthese bei Clostridium butylicum (FOSTER und MOAT, 1980).
4. Entstehung aus Acetat und Propionat, wie bei den Piericidinen A und B aus Streptomyces mobaraensis (KIMURA et al., 1969).
5. Entstehung aus Aspartat und Glycerat bzw. Pyruvat, wie beim Pyridomycin aus Streptomyces pyridomyceticus (OGAWARA et al., 1968).
6. Entstehung aus Lysin, wie beim Etamycin aus Streptomyces griseoviridus (HOOK und WINING, 1973).

Die Supplementierungsversuche mit Tryptophan zeigten, daß die Möglichkeiten 1-3 als Lieferanten des Pyridinrings im Nikkomycin D unwahrscheinlich sind. Da bei allen drei Reaktionen die Nikotinsäure hypothetische Ausgangsverbindung wäre, sollte es bei Tryptophanverfütterung nicht zu der beobachteten Verminderung der Nikkomycinproduktion kommen.

Markierungsversuche mit ^{14}C-Lysin gaben Hinweise darauf, daß diese Aminosäure als Vorstufe des Pyridinrings in Erwägung gezogen werden muß (SOMMER, 1981).

4.5.2. Überlegungen zur Biogenese des aliphatischen Rests im Nikkomycin D

Der stimulierende Effekt der drei Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin auf die Produktion der Nikkomycine durch den Wildtyp (KURTH, 1981) ließ aus strukturellen Gründen vermuten, daß diese verzweigtkettigen Aminosäuren direkt oder indirekt an der Synthese der Aminosäure der Nikkomycine beteiligt sind. Einfach-Mutanten mit Defekten in der Adenin-, Histidin- und Uracilbiosynthese konnten durch Zugabe verzweigtkettiger Aminosäuren zum RC-Medium nicht in ihrer Nikkomycinproduktion stimuliert werden, jedoch alle anderen Mutantenklassen. Die Mutante 901/282 kann Valin, Leucin, Histidin, Adenin und Guanin nicht mehr selbst synthetisieren, jedoch noch Isoleucin. Die Stimulation der Nikkomycin X-Synthese durch Histidinol zeigt, daß Leucin und Valin nicht zur Bildung von Nikkomycin X notwendig sind. Die Mutante 901/295 (ile$^-$, val$^-$ ura$^-$) wird in ihrer Nikkomycin X-Produktion nur durch Isoleucin, nicht aber durch Histidinol stimuliert.

Die mit diesen beiden Mutanten erzielten Ergebnisse zeigen, daß Isoleucin, nicht aber Leucin und Valin für die Synthese von Nikkomycin X notwendig ist.

Die Synthese an freiem Nikkomycin D wurde durch keines der Supplemente erhöht. Wenn man annimmt, daß Isoleucin oder eine seiner Vorstufen oder Abbauprodukte an der Synthese der Nikkomycin-Aminosäure beteiligt ist, könnte der stimulierende Effekt von Valin und Leucin auf die Nikkomycin-Produktion des Wildtyps durch regulatorische Einflüsse auf Enzyme der Aspartatfamilie zurückzuführen sein.

Bei E. coli und Salmonella typhimurium ist die Threonin-desaminase das einzige monovalent reprimierte Enzym der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren (GOTTSCHALK 1979). Dieses Enzym ist für die Biosynthese von Ile aus Threonin notwendig.
Eine andere Möglichkeit, die stimulierende Wirkung der verzweigtkettigen Aminosäuren zu erklären, wäre das Auftreten von Isoleucyl-Verbindungen, ähnlich dem N-Leucyl-Blasticidin, welches ein Vorläufer des Blasticidin S ist (SETO et al., 1968).

Die Wirkung der verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Nikkomycinproduktion konnte mit Mutanten nicht eindeutig erklärt werden. Die Abklärung dieser Biogenesewege muß mit Hilfe markierter Vorstufen gemacht werden, was nicht Gegenstand dieser Arbeit sein konnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe verschiedener Auxotrophie- und Resistenzmutanten wurde im Verlauf dieser Arbeit isoliert. Durch einen zweiten Mutationsschritt konnten Doppelmutanten hergestellt werden.

Die Verwendung von Auxotrophiemutanten in Verfütterungsexperimenten zeigte, daß sich die Uracilbase der Nikkomycine vom Stoffwechselweg der Pyrimidine und die Imidazolbase von der Histidinbiosynthese ableiten.

Es konnte gezeigt werden, daß Uracil- und Histidin-Mutanten in ihrer Nikkomycinsynthese verändert waren. Diese Mutanten erscheinen zur Mutasynthese geeignet.

Verfütterungsexperimente mit Mutanten, die in Biosynthesewegen verzweigtkettiger Aminosäuren blockiert sind, zeigten daß Isoleucin direkt oder regulatorisch an der Nikkomycinsynthese beteiligt ist.

Bei der Suche nach Strukturvariationen in der Nikkomycinreihe, konnte eine Reihe von Mutanten gefunden werden, die neue Peaks im HPLC-Elutionsdiagramm aufweisen. Diese Substanzen müssen noch chemisch charakterisiert werden.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

D'AMATO, R.F. and PISANO, M. A.: A chemically defined medium for cephalosporin C production by Peaecilomyces chrysogenum. J. Microbiol. Serol. 42: 299 - 308 (1976)

BRENNER, M. and AMES, B. N.: The histidine operon and its regulation. Metabolic regulation, vol. V (H. J. VOGEL, Ed.) New York: Academic Press Inc. 349 - 387 (1971)

BRILLINGER, G. U.: Chitin synthetase from fungi, a test model for substances with insecticidal properties. Arch. Microbiol., 121, 71 - 74 (1979)

BUCHANAN, J. G., HAMBLIN, M. R., SOOD, G. R. and WIGHTMAN R. H.: The Biosynthesis of Pyrazofurin and Formycin. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 19, 917 - 918 (1980)

BU LOCK, J. D.: Biosynthese von Naturstoffen. BLV, München, Basel, Wien (1970)

COHEN, E. and CASIDA, J. E.: Inhibition of Tribolium gut chitin synthetase. Pesticide Bioch. and Physiol. 13, 129 - 136 (1980)

DÄHN, U., HAGENMAIER, H., HÖHNE, H., KÖNIG, W. A., WOLF, G. und ZÄHNER, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. Arch. Microbiol. 107, 143 - 160 (1976)

DALKE, P. and MAGILL, J. M.: Specifity of uracil uptake in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 139, 212 - 219 (1979)

DAUM, S. J. and LEMKE, J. R.: Mutational biosynthesis of new antibiotics. An. Rev. Microbiol. 33, 241 - 265 (1979)

DEHLER, W.: Nikkomycine Studien zur Fermentation und Isolierung. Dissertation Universität Tübingen (1979)

DELIĆ, V., HOPWOOD, D. A. and FRIEND, E. J.: Mutagenesis by N-methyl-N -nitro-nitrosoguanidine in Streptomyces coelicolor. Mutation Res., Elsevier Publishing Company Amsterdam, 167 - 182 (1970)

DELZER, J.: Untersuchung des Nikkomycinmusters bei fünf verschiedenen Mutanten von Streptomyces tendae ETTLINGER Tü 901. Diplomarbeit Tübingen (1980)

DEMAIN, A. L. and MASUREKAR, P.: Lysine inhibition of in vivo homcitrate synthesis in Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol. 82, 143 - 151 (1974)

DERKOS-SOJAK, V., KORAJLIJA, J. and DELIC, V.: Histidine production by a regulatory mutant of Streptomyces coelicolor. Appl. Environ. Microbiol. 34, 621 - 625 (1977)

ENDO, A., KAKIKI, K. and MISATO, T.: Mechanism of action of the antifungal agent of polyoxin D. J. Bacteriol. 104, 189 - 196 (1970)

FIEDLER, H.-P.: Quantitation of nikkomycins in biological fluids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 204, 313 - 318 (1981)

FOSTER, J.W. and MOAT, A.G.: Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyrimidine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. Microbiol. Rev. 44, 83 - 105 (1980)

FRANKLIN, T.J., SNOW, G.A.: Biochemistry of antimicrobial action. Chapman and Hall, Ltd., London (1975)

GERZON, K., WILLIAMS, R. H., HOEHN, M., Gorman, M. and DE LONG, D. C.: Abstracts, 2 nd International Congress of Heterocyclic Chemistry. Montpelier, France (1969)

GHISALBA, O. and NÜESCH, J.: A genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in Nocardia

metiterranei. I. Isolation and characterization of the pentose-excreting auxotrophic mutant of Nocardia mediterranei with drastically reduced rifamycin production. J. Antibiot. 31, 202 - 214 (1978)

GOTTSCHALK, G.: Regulation of bacterial metabolism. In Bacterial metabolism (G. GOTTSCHALK, ed.), Springer, New York, Heidelberg, Berlin (1979)

GOULDEN, S.A. and CHATTAWAY, F.W.: Lysine control of α-aminoadipate and penicillin synthesis in Penicillium chrysogenum. Biochem. J. 110, 55 P

HAGENMAIER, H., KECKEISEN, A., ZÄHNER, H. und KÖNIG, W.A.: Aufklärung der Struktur des Nukleosidantibiotikums Nikkomycin X. Liebigs Ann. Chem. 1494 - 1502 (1979)

HARTMANN, S., NEEFF, J., HEER, U. and MECKE, D.: Arenaemycin (pentalenlactone): A specific inhibitor of glycolysis. FEBS-Letters 93, 339 - 342 (1978)

HOCHSTADT-OZER, J. and STADTMAN, E. R.: The regulation of purine utilization in bacteria. J. Biol. Chem. 246, 5304 - 5311 (1971)

HOLLIDAY, R.: A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. Nature (London) 178, 987 (1956)

HOOK, D.J. and WINING, L.C.: Biosynthesis of the peptide antibiotic Etamycin. Origin of the 3-hydroxypicolinyl and amino-acid fractions. J. C. S. Chem. Comm. 185 - 186 (1973)

HOPWOOD, D. A.: Genetic analysis and genome structure in Streptomyces coelicolor. Bacteriol. Rev. 31, 373 - 403 (1967)

HOPWOOD, D.A. and FERGUSON, H. M.: A rapid method for lyophilizing streptomyes cultures. J. Appl. Bacteriol. 32, 373 - 403 (1967)

HOPWOOD, D. A.: The isolation of mutants. Methods in Microbiology 3A, 363 - 430 (1970)

HOPWOOD, D. A., WRIGHT, H. M., BIBB, J. M. and COHEN, S. N.: Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces. Nature 268, 171 - 174 (1977)

HORI, M., KAKIKI, K., SUZUKI, S. and MISATO T.: Studies on the mode of action of Polyoxins Part III. Relation of polyoxin Structure to Chitin Synthese inhibition. Agr. Biol. Chem. 35, 1280 - 1291 (1971)

ISONO, K., NAGATSU, J., KAWASHIMA, Y. and SUZUKI, S.: Studies on Polyoxins, antifungal antibiotics. Part 1. Agr. Biol. Chem. 29, 848 - 854 (1965)

ISONO, K., KOBINATA, K. and SUZUKI, S.: Isolation and characterisation of polyoxins J, K and L. New components of polyoxin complex. Agr. Biol. Chem. 32, 792 - 793 (1968)

ISONO, K., CRAIN, P.F., ODIORNE, T.J., Mc. CLOSKEY J.A. and SUHADOLNIK, R.J.: Biosynthesis of 5-Fluorpolyoxins, aberrant nucleoside antibiotics. J. Am. Chem. Soc. 95, 5788 - 5789 (1973)

ISONO, K. and SUHADOLNIK, R. J.: The biosynthesis of natural and unnatural Polyoxins by Streptomyces cacaoi. Arch. Biochem. Biophys. 173, 141 - 153 (1976)

ISONO, K., SATO, T., HIRASAWA, K., FUNAYAMA, S. and SZUKUKI, S.: Biosynthesis of nuckloside skeleton of polyoxins. J. Am. Chem. Soc. 100, 3937 - 3939 (1978)

Isono, K. and SZUKUKI, S.: The Polyoxins: Pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. Heterocycles 13, 333 - 351 (1979)

KECKEISEN, A.: Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Nikkomycine. Dissertation Universität Tübingen (1979)

KIMURA, Y., TAKAHASHI, N. and TAMURA, S.: Biosynthesis of Piericidins A and B by Streptomyces mobaraensis. Agr. Biol. Chem. 33, 1507 - 1516 (1969)

KOMBINATA, K.; URAMOTO, M., NISHII, M., KUSAKABE, H., NAKAMURA, G. and ISONO, K.: Neopolyoxins A, B and C, new chitin synthetase inhibitors. Agr. Biol. Chem. 44, 1709 - 1711 (1980)

KÖNIG, W. A., PFAFF, K. P., SCHMALLE, H. und HAGENMAIER, H.: Konfiguration von 2 Amino-4-hydroxy-4-(5-hydroxy-2-pyridyl)-3-methylbuttersäure, der N-terminalen Aminosäure der Nikkomycine. Liebigs Ann. Chem., 1728 - 1735 (1980)

KÖNIG, W. A.: Persönliche Mitteilung (1981)

KURYLOWICZ, W.: Antibiotics. Polish Publishers, Warsaw (1976)

KURTH, R.: Persönliche Mitteilung (1981)

LANCINI, G.: Vortrag, International School of General Genetics of CCSEM VI Course, Microbial Breeding II. Erice (Italy) (1980)

LANGHÄRIG, J.: Aufstellung eines Produktionsspektrums von Tü 901 - Streptomyces tendae Ettlinger. Diplomarbeit Universität Tübingen (1978)

LEHNINGER, A. L.: Biochemistry. Worth Publishers, Inc. (1975)

MAHLER, H. R. and CORDES, E. H.: Biological Chemistry New York: Harper Internat. (1969)

MARTIN, J. F.: Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production, p. 19 - 37. In R. HÜTTER, T. LEISINGER, J. NÜESCH and W. WEHRLI (ed.) Antibiotics and other secondary metabolites Biosynthesis and production. Academic Press Inc., New York (1978)

MARTINELLI, E., ANTONINI, P., CRICCHIO, R., LANCINI, G. and WHITE, R. J.: Rifamycin R. a novel metabolite from a mutant of Nocardia mediterranei. J. Antibiotics 31, 949 - 951 (1978)

MISATO, T., KO, K. and YAMAMAGUCHI, I.: Use of antibiotics in agriculture. Adv. Appl. Microbiol. 21, 53 - 88 (1977)

MIZUNO, K., YAGINUMA, S., HAYASHI, M., TAKADA, M. and MUTO, N.: Salvage fermentation and enzymatic synthesis of Bredinin. J. Ferment. Technol. 53, 609 - 619 (1975)

MIZUNO, K., TSUJINO, M., TAKADA; M., HAYASHI, M., ATSUMI, K.; ASANO, K. and MATSUDA, T.: Studies on Bredinin. I. Isolation, characterisation and biological properties. J. Antibiotics 10, 775 - 782 (1974)

MÜLLER, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation Universität Tübingen (1968)

OGAWARA, H., MAEDA, K. and UMEZAWA, H.: The Biosynthesis of Pyridomycin. Biochemistry 7, 3296 - 3302 (1968)

OKANISHI, M., SUZUKI, K. and UMEZAWA, H.: Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: Cultural condition and morphological study. J. Gen. Microbiol. 80, 369 - 400 (1973)

OTTER, A. B., FALCO, E. A. and FOX, J. J.: Nucleosides. LXI. Transformations of Pyrimidin nucleosids in alkaline media. The Conversion of 5-hydroxyuridines into imidazoline nucleosides. J. Org. Chem. 34, 2636 - 2642 (1969)

PRIDHAM, T. G. and GOTTLIEB, D.: The utilization of Carbon Compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56, 107 - 114 (1948)

RINEHART, K. L. Jr.: Mutasynthesis of new antiobiotics. Pure Appl. Chem. 48, 1361 - 1384 (1977)

RINEHART, K. L. Jr.: Biosynthesis and mutasynthesis of aminocyclitol antibiotics. J. J. of Antibiotics 32, 32 - 46 (1979).

SASAKI, S., OHTA, N., YAMAGUSHI, KURODA, S. and MISATO, T. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 42, 633 (1968)

SASAJIMA, K. and YONED, M.: D-sedoheptulose-7-phosphate: D-glycerinaldehyde-3-phosphate glycerolaldehyde-transferase and D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase mutants of Bacillus species. Agr. Biol. Chem. 38, 1305 - 1310 (1974)

SCHLESINGER, S. and MAGASANIK, B.: Effect of α-methyl-histine on the control of histidine synthesis. J. Mol. Biol. 9, 611 - 623 (1964)

SCHUPP, T., HÜTTER, R. and HOPWOOD, D. A.: Genetic recombination in Nocardia mediterranei. J. Bacteriol. 121, 128 - 136 (1975)

SERMONTI, G. and SPADA-SERMONTI, I.: Gene recombination in Streptomyces coelicolor. J. gen. Microbiol. 15, 609 - 616 (1956)

SETO, H., OTAKE, N. and YONEHARA, H.: Studies on the biosynthesis of Blasticidin S. Part II. Leucylblasticidin S, a metabolic intermediate of Blasticidin S biosynthesis. Agr. Biol. Chem. 32, 1299 - 1305 (1968)

STAHLMANN, R.: Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der β-Lactam-Antibiotika. Pharmazie in unserer Zeit 8, 19 - 22 (1979)

SOMMER, U.: Persönliche Mitteilungen (1981)

SUHADOLNIK, R. J.: Nucleosides as biological probes. Wiley interscience publication (1979)

SWEENEY, M. S., DAVIES, F. A., GUTOWSKI, G. E., HAMILL, R. L., HOFFMAN, D. H. and POORE, G. A.: Experimental antitumor activity of Pyrazomycin. Cancer Res. 33, 2619 - 2630 (1973)

TOWNSEND, M. E., WRIGHT, H. M. and HOPWOOD, D. A.: Efficient mutagenesis by near ultraviolet light in the presence of 8-methoxypsoralen in Streptomyces. J. appl. Bacteriol. 34, 799 - 801 (1971)

URAMOTO, M. KOBINATA, K. and ISONO, K.: Structures of Neopolyoxins A, B. and C. Tetrahedron Letters 21, 3395 - 3398 (1980)

WILLIAMS, R. H. and HOEHN, M. M.: Patent 3802999 (1974)

WHITE, R. J., MARTINELLI, G. C. and LANCINI, G. C.: Ansamycin biogenesis: Studies on a novel rifamycin isolated from mutant strain of Nocardia mediterranei. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3260 - 3264 (1974)

YEP, D.: Triazole-alanine resistance in yeast. Dissertation Cornell University, USA (1975)

ZÄHNER, H. and MAAS, W. K.: Biology of antibiotics
Springer Verlag New York-Heidelberg-Berlin
(1972)

ZOEBELEIN, G. AMS 0896, ein Antibiotikum mit entwicklungshemmenden Eigenschaften bei Spinnmilben, Mitt. Biol. Bundesanstalt Land- und Forstwirtschaft 191, 282 (1979)

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und die vielen Anregungen danke ich Herrn Professor Dr. H. Zähner.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. R. Hütter, in dessen Abteilung der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ich das Gebiet der Streptomycetengenetik betrat.

Bei Herrn Dr. H.-P. Fiedler möchte ich mich für die Versuche zur Auftrennung der Nikkomycine mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie bedanken.

Herrn K. Wusch danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit.

L e b e n s l a u f

12.09.1954	geboren in Karlsruhe
1960 - 1964	ev. Volksschule Köln-Deutz
1965	Neusprachliches Gymnasium Köln-Deutz
1965 - 1973	Goethe-Gymnasium Karlsruhe
Juni 1973	Abitur am Goethe-Gymnasium
WS 1973/74	Immatrikulation in Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
SS 1974	Immatrikulation in Physik
Okt. 1975	Vordiplomprüfung in Biologie
Sept. 1976	Zwischenprüfung in Physik
März 1978	Diplomhauptprüfung in Biologie mit Hauptfach Mikrobiologie
April - Dez. 1978	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: Aufstellung eines Produktionsspektrums von Tü 901 - Streptomyces tendae Ettlinger - am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner
Jan. 1979 - Juli 1981	anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner Gastaufenthalt an der Eidgenössisch-Technischen Hochschule in Zürich (Feb. - April 1979)

Meine akademischen Lehrer waren:

K. - H. Altendorf, E. Bayer, V. Braun, D. Bunke, K. G. Grell, J. Guglielmi, K. Hantke, V. Hemleben, K. Henning, J. Höltje, R. Hütter, W. Löffler, D. Mecke, K. Poralla, H. Probst, W. Rähle, A. Rieker, H. Seiler, W. Seyffert, H. Stegmann, H. Straub, U. Schwarz, B. Schwemmle, G. Weitzel, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.